



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Aplicación de cascadas enzimáticas en la preparación de productos quirales

Autor

Sergio Paricio Sánchez

Director

Juan Mangas Sánchez

Grado en Biotecnología – Facultad de Ciencias

Curso 2020/2021

Abreviaturas:

1	ácido 2-(naftalen-1-iloxi)acético
2	2-(naftalen-1-iloxi)acetato de etilo
3	2-(naftalen-1-iloxi)etanol
4	2-(naftalen-1-iloxi)acetaldehído
5	1-(naftalen-1-iloxi)-3-nitropropan-2-ol
AcOEt	acetato de etilo
Na₂SO₄	sulfato de sodio
CH₂Cl₂	diclorometano
LiAlH₄	hidruro de litio y aluminio
DIBAL/DIBAL-H	hidruro de diisobutilaluminio
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
HBT	1-hydroxybenzotriazole
HPI	N-hydroxyphthalimide
TEMPO	(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl
eq	equivalentes de reacción
FAD	flavín adenín dinucleótido
CFE	cell-free extract
v/v	porcentaje en volumen
T_{eb}	temperatura de ebullición
t.a.	temperatura ambiente
RMN	resonancia magnética nuclear
DMSO	dimetilsulfóxido
THF	tetrahidrofurano
TBME	tert-butil metil éter
EtOH	etanol
MeNO₂	nitrometano
BSA	albúmina de suero bovino
CAL-B	lipasa B de <i>Candida antarctica</i>

Índice

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 Biocatálisis: antecedentes, beneficios y limitaciones.....	2
1.2 Biocatálisis en la industria farmacéutica.....	4
1.3 Propranolol: características, mecanismo de acción y aplicaciones.....	6
1.4 Síntesis química del propranolol.....	6
2. Objetivos.....	7
3. Materiales y métodos.....	8
3.1 Instrumentación y reactivos.....	8
3.2 Síntesis química del alcohol de partida.....	9
3.3 Ensayos de oxidación enzimática.....	10
3.3.1 Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	10
3.3.2 Alcohol oxidasa de <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	11
3.4 Estudios de la reacción de Henry catalizada por lipasas.....	11
3.5 Escalado para la obtención del β -nitroalcohol racémico mediante combinación en cascada de la oxidación enzimática y la reacción de Henry.....	11
4. Resultados y discusión.....	12
4.1 Síntesis química del alcohol de partida.....	12
4.1.1 Esterificación de Fischer.....	12
4.1.2 Reducción de 2 con DIBAL-H para la obtención del alcohol primario 3 ...	12
4.2 Oxidación enzimática con la lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	13
4.2.1 Efecto del tampón.....	14
4.2.2 Efecto del cosolvente.....	16
4.2.3 Efecto de la proporción de cosolvente.....	17
4.2.4 Efecto de la temperatura, agitación y presencia de Cu^{2+}	17
4.3 Oxidación enzimática con la alcohol oxidasa de <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	18
4.4 Estudios de la reacción de Henry catalizada por lipasas.....	19
4.5 Escalado para la obtención del β -nitroalcohol racémico mediante combinación en cascada de la oxidación enzimática y la reacción de Henry.....	21
5. Conclusiones.....	22
6. Bibliografía.....	24

Resumen

Ante la creciente complejidad molecular de los nuevos fármacos y la necesidad de desarrollar procesos más eficientes y respetuosos con el medioambiente, la biocatálisis se erige como una herramienta de especial interés en la industria farmacéutica. Las enzimas presentan una serie de beneficios como son su gran selectividad, ser activas en condiciones suaves de reacción y la posibilidad de combinar pasos consecutivos en cascada.

El propranolol es un fármaco betabloqueante no cardiosselectivo con dos enantiómeros posibles, de los cuales solo el *S* tiene actividad antagonista significativa frente a los receptores β -adrenérgicos. Con el objetivo de poder obtener ambos enantiómeros por separado, se planteó una ruta de síntesis biocatalítica a partir de un compuesto disponible comercialmente, ya que con los actuales métodos de síntesis industriales se obtiene el propranolol racémico.

En este trabajo, se describe la síntesis de un β -nitroalcohol intermedio en la síntesis de propranolol mediante la combinación de una oxidación enzimática y una reacción de Henry. En primer lugar, se realizó la síntesis del alcohol de partida a partir de un ácido carboxílico comercial. Posteriormente, se estudió y optimizó la oxidación enzimática utilizando diferentes sistemas biocatalíticos como la lacasa de *Trametes versicolor* y la colina oxidasa de *Arthrobacter chlorophenolicus* modificada. Tras esto, se estudió la reacción de Henry catalizada por lipasas para comprobar la estereoselectividad de la reacción y determinar si la reacción ocurre por catálisis específica o inespecífica. Finalmente, se realizó un escalado para la obtención del β -nitroalcohol racémico mediante la combinación en cascada y en 'one pot' de la oxidación enzimática catalizada por la lacasa de *Trametes versicolor* y la reacción de Henry.

Given the increasing molecular complexity of new drugs and the need to develop more efficient and environmentally friendly processes, biocatalysis is emerging as a tool of special interest in the pharmaceutical industry. Enzymes have several benefits such as high selectivity, being active under mild reaction conditions and the possibility of combining consecutive steps in cascade.

Propranolol is a non-cardiosselective beta-blocker drug with two possible enantiomers, of which only the *S* enantiomer has significant antagonist activity against β -adrenergic receptors. In order to obtain both enantiomers separately, a biocatalytic synthetic route is herein proposed starting from a commercially available compound, since current industrial synthesis methods yield racemic propranolol.

First, the synthesis of the starting alcohol was carried out by Fischer esterification followed by reduction with DIBAL-H. Subsequently, enzymatic oxidation assays were performed and optimised using different enzymatic systems to access the corresponding aldehyde. After this, the Henry reaction catalysed by lipases was studied to determine whether the reaction occurs by specific or non-specific catalysis. Finally, a scale-up was performed to obtain the racemic β -nitroalcohol by combining the enzymatic oxidation with the Henry reaction via a one-pot sequential cascade.

1. Introducción

1.1 Biocatálisis: antecedentes, beneficios y limitaciones

La biocatálisis es el uso de enzimas aisladas o células microbianas enteras como catalizadores en reacciones químicas. Se puede clasificar en dos tipos. El primero consiste en el uso de células microbianas que expresan una o varias enzimas de interés para catalizar la conversión de un reactivo. El segundo tipo consiste en el uso de enzimas libres purificadas o lisados celulares en los que se encuentre la enzima o enzimas de interés (1).

El uso de enzimas aisladas no comenzó hasta la década de 1970 gracias al desarrollo de la tecnología de DNA recombinante y sus aplicaciones estaban limitadas a tan solo unos pocos procesos industriales para la producción de alimentos y detergentes. Fue a partir de la mitad de la década de 1980 cuando la biocatálisis empezó a considerarse en la industria química. Esto fue motivado por la toma de conciencia respecto a la gran cantidad de residuos generados, hecho incompatible con la necesidad de desarrollar procesos más sostenibles, y también por el descubrimiento de que en la mayoría de los fármacos que presentan uno o varios enantiómeros posibles, solo uno de ellos tiene efectos farmacológicos. Un buen ejemplo de las aplicaciones de la biocatálisis en esta década es la síntesis industrial de ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) mediante la enzima penicilina amidasa, producida mediante DNA recombinante e inmovilizada para poder ser reutilizada y reducir los costes de producción de esta penicilina semisintética (1).

A principios de la década de 1990 ya se conocía el potencial que podía tener la biocatálisis para la síntesis orgánica en la industria, pero era necesario ampliar el rango de sustratos que las enzimas podían transformar y mejorar su rendimiento y estabilidad en condiciones adecuadas para la industria (1).

Las revisiones bibliográficas sobre biocatálisis publicadas a principios de los 2000 destacaban el uso de lipasas (como CAL-B) o amidasas (como la penicilina amidasa y la subtilisina) para la resolución cinética de alcoholes primarios y secundarios, aminas o ácidos carboxílicos quirales. También destacaban las cetereductasas (KREDs) para producir alcoholes secundarios quirales por reducción asimétrica de cetonas proquirales. Uno de los procesos biocatalíticos más importantes que se realizaba a gran escala en la industria era la transformación de acrilonitrilo en acrilamida por la nitrilo hidratasa (NHase) de *Rhodococcus rhodochrous* J1 (se utilizaban células enteras). Desde entonces se han empleado muchas más enzimas en procesos biocatalíticos a gran escala y a día de hoy es una tecnología que la mayor parte de la industria química tiene en cuenta a la hora de desarrollar nuevos procesos de síntesis (2).

No todas las reacciones catalizadas por enzimas que funcionan a escala de laboratorio lo hacen a escala industrial. Esto también ocurre cuando se intenta implementar una nueva reacción química en la industria. Existen varios motivos por los que puede ser difícil la implementación y escalado. Por ejemplo, un nuevo proceso que se quiera implementar en la industria podría no llegar a llevarse a cabo simplemente porque requeriría una inversión que quizá no sea rentable si el proceso actual todavía genera suficientes beneficios. Afortunadamente, las reacciones biocatalíticas no suelen requerir equipamiento especial y en muchos casos pueden utilizarse los mismos reactores que en la síntesis química (2).

Otro motivo común es que el tiempo de desarrollo sea demasiado largo o que surjan dificultades a la hora de desarrollar el proceso o en el procesamiento posterior. Estos

problemas se pueden mitigar conformando un equipo interdisciplinario para planificar la mejor ruta de síntesis e implementar enzimas modificadas si es necesario, y también apoyándose en el conocimiento de los procesos biocatalíticos desarrollados hasta el momento y que pueden encontrarse descritos en la bibliografía (2).

En la estrategia para diseñar rutas de producción de un compuesto mediante biocatálisis juega un papel fundamental el concepto de retrosíntesis. La retrosíntesis consiste en dividir de forma lógica la molécula objetivo en varias partes para establecer una secuencia de estructuras precursoras más sencillas hasta llegar a una molécula que sea más simple y se encuentre disponible comercialmente. Es una técnica que se emplea habitualmente en síntesis orgánica y que es igualmente útil en biocatálisis, con la única diferencia que los pasos planteados tienen que poder ser catalizados por enzimas disponibles o modificadas en lugar de reactivos químicos o catalizadores químicos convencionales. Para diseñar la ruta de retrosíntesis hay que decidir qué tipo de enzima y qué reacción es la más adecuada en cada paso para alcanzar el producto deseado.

Los costes de producción dependen en gran medida de la infraestructura de producción disponible, pero sobre todo de la elección de los productos de partida y del rendimiento de la reacción. Se pueden definir unos indicadores clave de rendimiento para estimar el coste (2):

- Rendimiento (%) y selectividad o exceso enantiomérico (% ee)
- Concentración inicial de sustrato (g/L)
- Rendimiento espacio-tiempo (g/L·h)
- Consumo de catalizador (g enzima/kg producto)

El avance de la biocatálisis se debe en gran medida al desarrollo de disciplinas como la metagenómica, la bioinformática, la ingeniería de proteínas, la ingeniería metabólica y el cribado y análisis de alto rendimiento (*high-throughput*). Las colaboraciones entre grandes farmacéuticas, instituciones académicas y compañías especializadas en biocatálisis también han impulsado el uso de enzimas en la industria (2,3). Aunque si hay que señalar un elemento clave en el éxito de la biocatálisis es el desarrollo de la evolución dirigida (1).

La disponibilidad de una mayor variedad de enzimas a un coste más asequible (gracias a los avances en la expresión de genes recombinantes en hospedadores microbianos muy estudiados como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*) y la capacidad de generar enzimas con las características deseadas mediante evolución dirigida, junto a nuevos sistemas de regeneración de cofactores (como NADH y ATP), ha permitido la expansión de la biocatálisis en sustitución de procesos en los que antes se utilizaban catalizadores metálicos. Además, las enzimas modificadas pueden llegar a presentar una estereoselectividad cercana al 100%, por lo que es difícil igualarlas con otros métodos (1).

La evolución dirigida de enzimas promiscuas, el desarrollo de metaloenzimas artificiales y la incorporación de aminoácidos no canónicos (distintos de los 20 naturales) en enzimas de interés puede conducir en los próximos años a la invención de nuevas reacciones biocatalíticas (1).

La biocatálisis tiene una serie de beneficios y limitaciones como cualquier otra disciplina y estos se deben valorar a la hora de plantear y desarrollar procesos de síntesis catalizados por enzimas. Están recogidos en la siguiente tabla.

	<i>Beneficios</i>	<i>Limitaciones</i>
<i>Selectividad</i>	Las enzimas son muy selectivas, por lo general transforman un solo sustrato. Esto permite evitar los pasos de protección/desprotección de diferentes grupos químicos.	La alta selectividad de las enzimas limita el número de sustratos que aceptan en su centro activo y, por tanto, las transformaciones que catalizan.
<i>Condiciones de reacción</i>	Las enzimas generalmente actúan en medio acuoso y condiciones suaves, por lo que se requiere menos aporte de energía en los procesos y las condiciones de producción son más seguras.	Las enzimas no están preparadas para trabajar en las condiciones de la industria (disolventes orgánicos, altas concentraciones de sustrato, pH o temperatura no fisiológicos, etc.).
<i>Eficiencia catalítica</i>	Es posible obtener enzimas con las características deseadas mediante evolución dirigida, consiguiendo así enzimas que catalizan la transformación de determinados sustratos en productos de interés, o que son activas en condiciones de pH y/o temperaturas distintas a las fisiológicas.	Pueden presentar baja eficiencia catalítica con sustratos que son estructuralmente diferentes a los que catalizan normalmente en la naturaleza, porque han evolucionado para transformar ese sustrato en concreto.
<i>Estereoselectividad</i>	Generan productos de alta pureza enantiomérica, esencial en la industria farmacéutica. Por lo general, solo uno de los enantiómeros tiene efecto farmacológico.	Las enzimas suelen presentar quimio y estereoselectividad en moléculas con varios grupos funcionales. Con sustratos no naturales la selectividad puede no ser tan alta.
<i>Procesos en cascada</i>	Gracias a las propiedades de las enzimas, es posible construir pasos consecutivos de reacción sin necesidad de purificar los intermedios de reacción (procesos en cascada). Se ahorra tiempo, esfuerzo y generación de residuos.	<i>Ninguna</i>

Tabla 1. Beneficios y limitaciones de la biocatálisis (4).

1.2 Biocatálisis en la industria farmacéutica

Ante la creciente complejidad molecular de los nuevos fármacos y la necesidad de desarrollar procesos más eficientes y respetuosos con el medioambiente, la biocatálisis se erige como una herramienta con gran potencial en la industria farmacéutica. Es por esto que en los últimos años ha pasado a formar parte de las tecnologías que se considera emplear para la síntesis de nuevos fármacos (5).

La aplicación de la catálisis enzimática en los procesos de fabricación de fármacos presenta una serie de beneficios como son la gran selectividad de las enzimas y una mayor seguridad.

Sin embargo, el verdadero potencial de la biocatálisis reside en la combinación de dos o más pasos consecutivos en cascada, ya que permite ahorrar recursos al evitar el aislamiento y purificación de compuestos generados en pasos intermedios. Además, se puede acoplar reacciones desfavorables a otras que no lo sean (de esta forma el producto generado en la reacción desfavorable es consumido en la siguiente reacción, lo que permite que se siga generando más producto) y evitar la inhibición enzimática gracias a que se van consumiendo los intermedios que se forman. La aplicación de cascadas es posible gracias a la gran quimioselectividad de las enzimas y a que muchas de ellas pueden trabajar en un conjunto común de condiciones suaves en medio acuoso (6). En el caso de que se requiera cambiar las condiciones de pH y/o temperatura, por ejemplo, en alguno de los pasos, se pueden retirar las enzimas si se encuentran inmovilizadas en un soporte sólido (es lo más conveniente porque permite reutilizar las enzimas y reducir el coste del proceso).

Para poner esto en práctica es necesario identificar las enzimas que se van a utilizar y tener la capacidad de modificarlas mediante ingeniería de proteínas para que catalicen la transformación de sustratos no naturales a concentraciones adecuadas para la industria (3,6). Un ejemplo de la aplicación de la biocatálisis en la industria farmacéutica es la producción del fármaco experimental islatravir, un análogo de los nucleósidos que actúa como inhibidor de la translocación de la transcriptasa inversa del VIH. Este fármaco se produce mediante una cascada enzimática de tres pasos en la que participan enzimas como fosforilasas, aldolasas, oxidasas y quinasas, entre otras. De las nueve enzimas que intervienen en la ruta de síntesis, cinco de ellas han sido modificadas por evolución dirigida para actuar sobre sustratos no naturales y las otras cuatro son *wild-type*, es decir, no se han modificado y son las enzimas “naturales” (6).

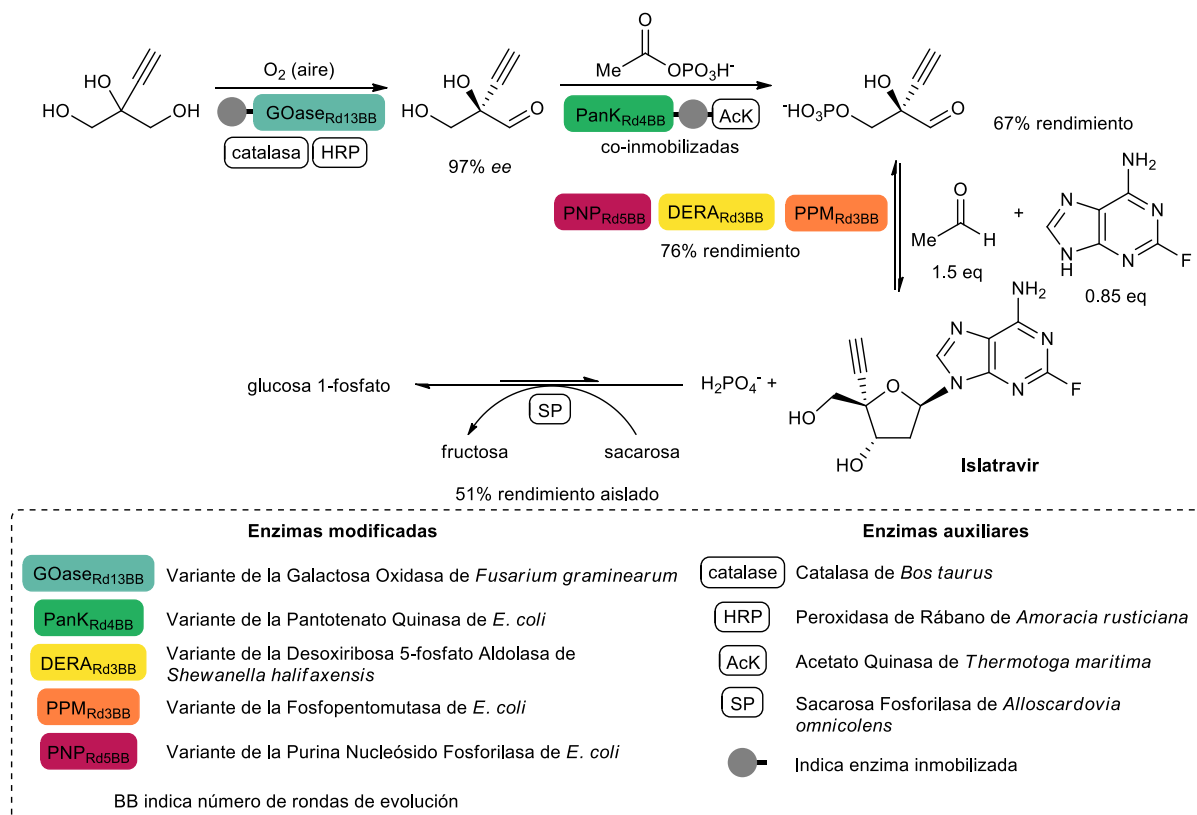


Figura 1. Ruta biocatalítica completa para la síntesis del fármaco experimental islatravir (6).

1.3 Propranolol: características, mecanismo de acción y aplicaciones

El propranolol es una molécula cuya fórmula empírica es $C_{16}H_{21}NO_2$ y su peso molecular es 259,34 g/mol. Su nombre sistemático es 1-(isopropilamino)-3-(1-naftiloxi)-2-propanol, aunque existen otras formas correctas de nombrarlo (7,8). Su número CAS es [525-66-6] (7). La característica más importante de esta molécula es que posee un centro quiral en el carbono 2, de forma que el grupo OH puede encontrarse en dos orientaciones diferentes, por lo que la molécula tiene 2 enantiómeros: (*R*) y (*S*)-propranolol.

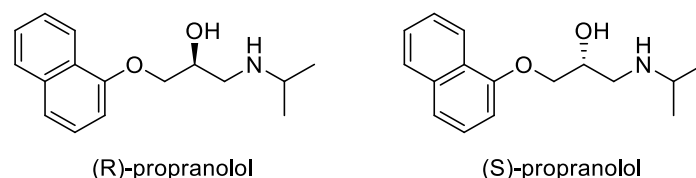


Figura 2. Enantiómeros del propranolol.

El propranolol pertenece a un grupo de medicamentos llamados betabloqueantes y es no cardiosselectivo (tiene efectos en el corazón, pero también en otras partes del cuerpo). Inhibe la respuesta a estímulos adrenérgicos bloqueando de forma competitiva los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 (7). Los ligandos naturales de estos receptores son las catecolaminas endógenas, adrenalina y noradrenalina, las cuales provocan su activación (8). Los receptores β_1 se encuentran en el miocardio y los β_2 en el tejido muscular liso de los bronquios y en los vasos sanguíneos del tejido muscular esquelético (7,8). El propranolol es una mezcla racémica, pero solo el enantiómero *S* tiene una actividad antagonista significativa frente a estos receptores (su afinidad es aproximadamente 100 veces mayor que la del enantiómero *R*) (9,10).

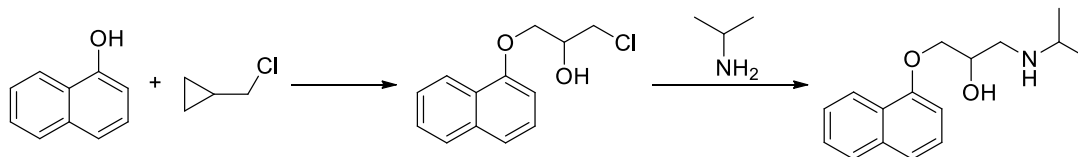
Al bloquear los receptores β -adrenérgicos del miocardio, el propranolol disminuye el ritmo cardíaco, la contractilidad del miocardio y el gasto cardíaco, y aumenta el tiempo de eyección sistólica y el volumen cardíaco. Además, disminuye la velocidad de conducción a través de los nodos sinoatrial y atrioventricular (7). También evita el aumento del ritmo cardíaco como consecuencia del ejercicio, por lo que es considerada una sustancia prohibida en la práctica deportiva a nivel competitivo (11). Mediante el bloqueo de los receptores β_2 se produce una reducción de la broncodilatación y de la vasodilatación (8).

Se comercializa como hidrocloreto de propranolol en forma racémica para tratar la hipertensión, la angina de pecho, algún tipo de arritmias, feocromocitoma y para la protección del corazón después de un infarto de miocardio. También se utiliza para controlar la miocardiopatía hipertrófica. Sirve para controlar los síntomas de cierto tipo de enfermedades tiroideas (tirotoxicosis e hipertiroidismo, causadas por una glándula tiroidea hiperactiva), trastorno de ansiedad y temblor esencial, además de para la profilaxis de la migraña y las hemorragias en el esófago causadas por una elevada presión arterial en el hígado (7,9,12).

1.4 Síntesis química del propranolol

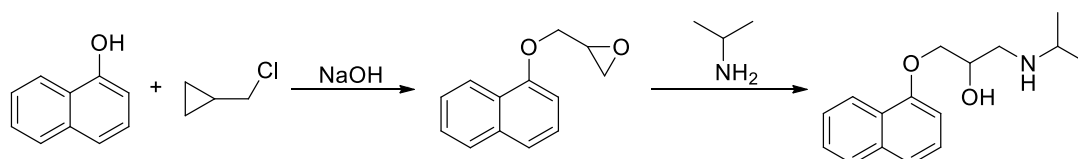
En la actualidad hay dos maneras de sintetizar el propranolol en la industria, las cuales se realizan a partir de los mismos productos de partida: 1-naftol y epiclorhidrina. Se obtiene el fármaco racémico de ambas formas.

El primer método consiste en hacer reaccionar el 1-naftol con la epiclorhidrina de forma que se produzca la apertura del anillo epóxido para dar 1-cloro-3-(1-naftiloxi)-2-propanol. Este compuesto se hace reaccionar con isopropilamina para producir el propranolol (7,8,13).



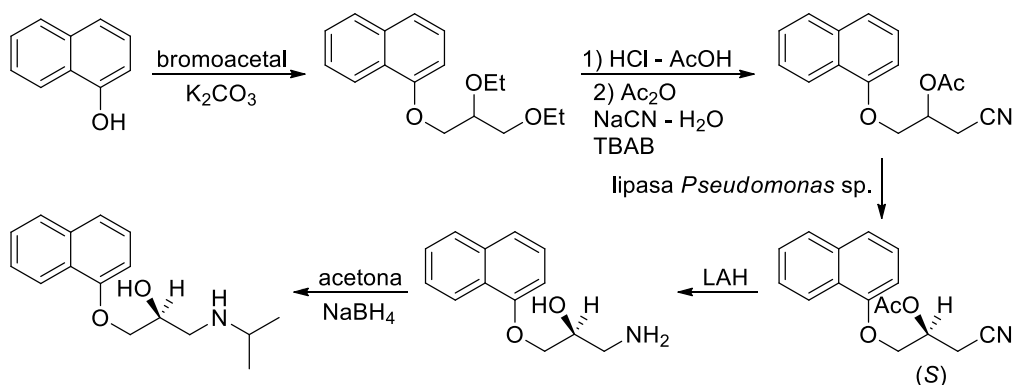
Esquema 1. Preparación de propranolol a partir de 1-naftol y epiclorhidrina.

El segundo método consiste en hacer reaccionar los mismos compuestos de partida en presencia de una base. Esto da un producto llamado 3-(1-naftiloxi)propilenóxido, el cual también se hace reaccionar con isopropilamina de manera que se produce la apertura del anillo epóxido y se forma el propranolol (7,8).



Esquema 2. Preparación de propranolol a partir de 1-naftol y epiclorhidrina en medio básico.

Existen numerosas aproximaciones experimentales para la producción de propranolol. Una de estas aproximaciones consiste en la síntesis de S-propranolol a partir de 1-naftol, utilizando en un paso intermedio una lipasa de *Pseudomonas* sp. para la resolución cinética del enantiómero S (7). El inconveniente de esta síntesis es que posee un paso de protección/desprotección.

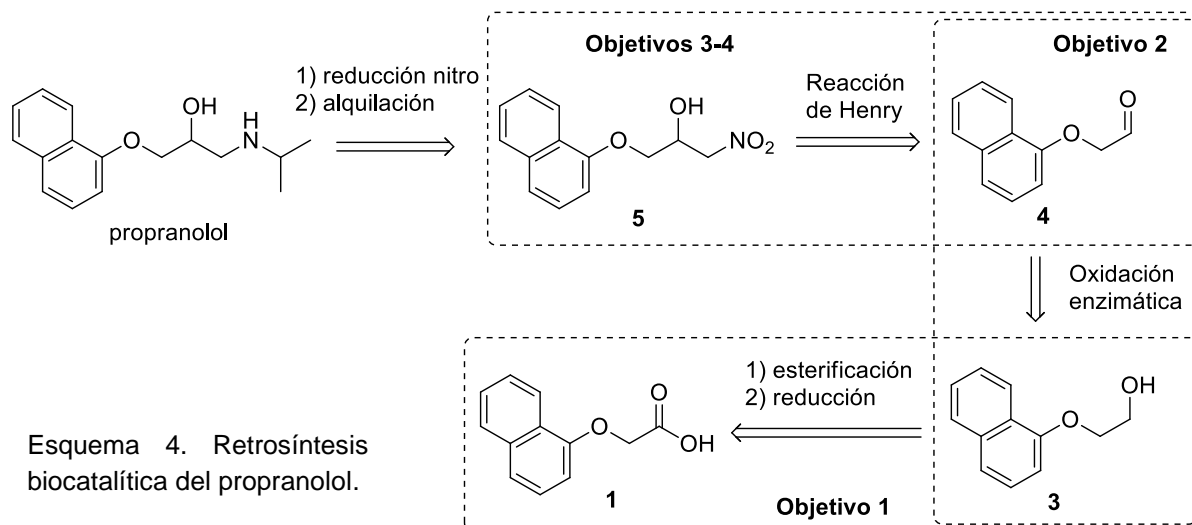


Esquema 3. Síntesis de propranolol utilizando una lipasa para la resolución del enantiómero S (7).

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo de fin de grado es diseñar una ruta de síntesis de un intermedio clave en la preparación de propranolol mediante el uso de enzimas en todos los pasos en los que sea posible, optimizar las condiciones de cada una de las reacciones enzimáticas y posteriormente aplicar estas reacciones en cascada para, de esta forma, minimizar los pasos de purificación y aislamiento. Para ello, se plantea la siguiente

retrosíntesis biocatalítica del propranolol (Esquema 4) atendiendo a criterios de disponibilidad comercial de reactivos y catalizadores.



La elección de esta ruta de síntesis se debe a la disponibilidad comercial del ácido carboxílico **1** de partida, a la disponibilidad de las enzimas necesarias y a la posibilidad de llegar al aldehído **4** mediante la oxidación del alcohol **3** utilizando distintos procesos de oxidación mediada por enzimas.

Una vez elegida la ruta, sabiendo los pasos que se van a seguir, se proponen los siguientes objetivos:

1. Obtener el alcohol y el aldehído por síntesis química a partir del ácido carboxílico comercial **1** mediante esterificación de Fischer y reducción con DIBAL-H.
2. Estudio de la oxidación enzimática mediante diferentes métodos enzimáticos y optimización de ésta.
3. Estudio de la reacción de Henry catalizada por lipasas.
4. Combinación en cascada de la oxidación enzimática y la reacción de Henry para la obtención del β -nitroalcohol **5** de interés.

3. Materiales y métodos

3.1 Instrumentación y reactivos

3.1.1 Instrumentación

Los experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) de los núcleos ^1H y ^{13}C se llevaron a cabo a temperatura ambiente en el espectrómetro Bruker AV-400 utilizando cloroformo deuterado como disolvente.

3.1.2 Reactivos

Todos los disolventes utilizados provienen de fuentes comerciales y se utilizan tal y como se reciben, con la excepción de las disoluciones tampón, que fueron preparadas en el laboratorio. Todos los reactivos, la lacasa de *Trametes versicolor* y las lipasas, provienen también de fuentes comerciales. La alcohol oxidasa de *Arthrobacter chlorophenolicus* fue

cedida por la empresa Prozomix Ltd. y el grupo del Prof. Nicholas Turner de la Universidad de Manchester.

3.2 Síntesis química del alcohol de partida

Se realizó la síntesis del alcohol de partida, sustrato de la oxidación enzimática, a partir del ácido 2-(naftalen-1-iloxi)acético **1**, disponible comercialmente como un sólido rojizo. En primer lugar, se llevó a cabo una esterificación de Fischer para la obtención del éster **2** y, en segundo lugar, una reducción con DIBAL-H bajo diferentes condiciones de reacción para conseguir el alcohol **3** y el aldehído **4**.

Esterificación de Fischer

Sobre una disolución de ácido 2-(naftalen-1-iloxi)acético **1** (500 mg, 2.47 mmol) en etanol (1 mL por cada 0.1 g de sustrato) se adicionó ácido sulfúrico (1 mL por cada 3 g de sustrato). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura de ebullición del etanol (78°C, reflujo) y se monitorizó mediante cromatografía en capa fina. Pasadas 24 horas, se realizó la extracción de la mezcla de reacción con acetato de etilo (AcOEt). Se recogió la fase orgánica, se añadió Na₂SO₄ anhidro para retirar el agua, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. El producto **2** se aisló como un aceite rojizo de forma pura, sin necesidad de purificación (502 mg, 88% rendimiento aislado).

Reducción con DIBAL-H

Sobre una disolución 0.1 M de 2-(naftalen-1-iloxi)acetato de etilo **2** (502 mg, 2.18 mmol) en diclorometano (19.4 mL) se adicionó gota a gota 1.1 equivalentes de DIBAL-H (2.4 mL). La adición se realizó en atmósfera inerte (Ar) sobre la mezcla de reacción, la cual estaba en un matraz Schlenk en un baño de acetona y nitrógeno líquido a -78°C. Tras la adición del DIBAL-H, se sustituyó el baño a -78°C por uno de hielo a 0°C y se dejó reaccionar con agitación durante 24 horas. La reacción se monitorizó mediante cromatografía en capa fina. Una vez consumido el producto de partida, se adicionó agua para parar la reacción, se realizó la extracción de la mezcla de reacción con diclorometano (CH₂Cl₂), se recogió la fase orgánica, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna en silica gel (eluyente AcOEt:Hexano 2:8) para obtener el correspondiente aldehído **4** como un aceite incoloro (347 mg, 85% rendimiento aislado). El rendimiento global de la producción del aldehído es el 75%.

Para la obtención del alcohol **3** se siguió el mismo procedimiento, con la diferencia de que se adicionaron 2 equivalentes de DIBAL-H con la mezcla de reacción a 0°C y posteriormente la reacción transcurrió a temperatura ambiente. Tras la separación por cromatografía en columna, se obtuvo el producto como un aceite anaranjado (730 mg, 89% rendimiento aislado). El rendimiento global de la producción del alcohol es el 79%.

3.3 Ensayos de oxidación enzimática

Se ensayó la oxidación enzimática del sustrato 2-(naftalen-1-iloxi)etanol **3** con dos enzimas diferentes. Por un lado, con la lacasa del hongo *Trametes versicolor* y, por otro, con la alcohol oxidasa de *Arthrobacter chlorophenolicus*.

3.3.1 Lacasa de *Trametes versicolor*

Ensayo de distintos disolventes

Se ensayaron dos disoluciones tampón: tampón citrato pH 5 y tampón acetato pH 5. Para ello, se prepararon disoluciones de 2-(naftalen-1-iloxi)etanol **3** (15 mg, 0.08 mmol) en DMSO (160 μ L) y se añadieron 0.33 equivalentes de TEMPO (4.1 mg). Por otro lado, se disolvieron 5 U de lacasa (6 mg) en las dos disoluciones tampón pH 5 (720 μ L) y finalmente se mezclaron ambas disoluciones en viales para que se produzca la reacción. Esta se llevó a cabo con los viales abiertos, a temperatura ambiente y con agitación mecánica a 200 rpm durante 24 horas. Pasado el tiempo de reacción, el contenido de cada uno de los viales se pasó a microtubos de 1.5 mL, la mezcla de reacción se extrajo con AcOEt y ambas fases se separaron mediante centrifugación. Tras evaporar el disolvente, se añadió al crudo de reacción cloroformo deuterado y las conversiones se calcularon mediante ^1H -RMN.

Ensayo de distintos cosolventes

Los cosolventes ensayados fueron: DMSO, ciclohexano, THF, acetonitrilo y TBME. Se prepararon disoluciones de 2-(naftalen-1-iloxi)etanol **3** (15 mg, 0.08 mmol) en los distintos cosolventes (400 μ L) y se añadieron 0.33 equivalentes de TEMPO (4.1 mg). Por otro lado, se disolvieron 5 U de lacasa (6 mg) en la disolución tampón citrato pH 5 (400 μ L) y finalmente se mezclaron ambas disoluciones en viales para que se produzca la reacción (disolvente y cosolvente en relación 1:1 v/v). El crudo de reacción se obtuvo de la misma forma que en el ensayo anterior y se calcularon las conversiones mediante ^1H -RMN.

Ensayo de distintas proporciones de cosolvente

Una vez elegido el cosolvente, se procedió a la determinación de la cantidad óptima. Para ello, se prepararon reacciones con un 30% y con un 70% de cosolvente (v/v) y se dejaron reaccionar a temperatura ambiente con agitación mecánica a 200 rpm durante 24 horas. En este caso, las cantidades de reactivos utilizadas fueron: 18.6 mg de 2-(naftalen-1-iloxi)etanol **3**, 5.1 mg de TEMPO y 7.4 mg de enzima en un volumen final de 1 mL. Las conversiones de las reacciones se calcularon mediante ^1H -RMN.

Ensayo de distintas temperaturas, tipo de agitación y presencia/ausencia de Cu^{2+}

Para ensayar el efecto de estos parámetros se prepararon las siguientes reacciones en un volumen final de 0.8 mL: ciclohexano sin Cu^{2+} a temperatura ambiente, ciclohexano con Cu^{2+} a temperatura ambiente, ciclohexano con Cu^{2+} sin enzima a temperatura ambiente (control negativo), TBME sin Cu^{2+} a temperatura ambiente, TBME con Cu^{2+} a temperatura ambiente y

ciclohexano sin Cu^{2+} con agitación orbital a 30°C. Se preparó una disolución 100 mM de CuSO_4 (125 mg, 0.5 mmol) en tampón citrato pH 5 (5 mL). Para las reacciones que contienen cobre: 40% tampón citrato pH 5, 10% disolución de CuSO_4 y 50% cosolvente orgánico (v/v). Para las reacciones sin cobre: 50% tampón citrato pH 5 y 50% cosolvente orgánico (v/v). Se utilizaron 0.33 equivalentes de TEMPO y 5 U de enzima (6 mg). Pasadas 24 horas, se obtuvieron los crudos de reacción de la misma forma que en los primeros ensayos y se calcularon las conversiones mediante ^1H -RMN.

3.3.2 Alcohol oxidasa de *Arthrobacter chlorophenolicus*

Se ensayaron dos CFE (cell free extract), uno de ellos preparado por la empresa Prozomix Ltd. y otro por el grupo del profesor Nicholas Turner de la Universidad de Manchester. Se prepararon disoluciones de 2-(naftalen-1-iloxi)etanol **3** (9.4 mg, 0.05 mmol) en ciclohexano (0.5 mL) y disoluciones de ambos CFE (6 mg/mL) en tampón fosfato pH 8 (0.5 mL). Se mezclaron las disoluciones del sustrato y el CFE correspondiente y se dejaron reaccionar a 30°C con agitación orbital a 200 rpm durante 24 horas. De forma paralela, se realizó también un control positivo utilizando alcohol cinamílico como sustrato. Pasado el tiempo de reacción, se estudió de forma cualitativa la conversión mediante cromatografía en capa fina.

3.4 Estudios de la reacción de Henry catalizada por lipasas

Se ensayaron BSA y las lipasas CAL-B (*Candida antarctica*), Amano lipase PS (*Burkholderia cepacia*) y Amano lipase A (*Aspergillus niger*). Se prepararon disoluciones de benzaldehído (5.3 mg, 0.05 mmol) en TBME y disoluciones de cada una de las proteínas (30 mg) en tampón fosfato pH 7. Se prepararon reacciones con distinta proporción en volumen de disolvente y cosolvente: 100% TBME, 90% TBME + 10% tampón, 70% TBME + 30% tampón, 50% TBME + 50% tampón. De forma paralela, se realizaron controles sin enzima con las mismas proporciones de disolvente y cosolvente. A estas mezclas de reacción se les adicionó nitrometano (61 mg, 1 mmol) y se dejaron reaccionar a 37°C con agitación orbital a 200 rpm durante 24 horas. Pasado el tiempo de reacción, se estudió de forma cualitativa la conversión mediante cromatografía en capa fina.

3.5 Escalado para la obtención del β -nitroalcohol racémico mediante combinación en cascada de la oxidación enzimática y la reacción de Henry

Se preparó una disolución de 2-(naftalen-1-iloxi)etanol **3** (81 mg, 0.435 mmol) en ciclohexano (2.15 mL) y se adicionaron 0.33 equivalentes de TEMPO (22.4 mg). Se preparó un mismo volumen de una disolución de 10 U de lacasa (12 mg) en tampón citrato pH 5 y finalmente se mezclaron ambas disoluciones en un vial (concentración final de sustrato 0.1 M). Se dejaron reaccionar a 37°C con agitación orbital a 200 rpm durante 24 horas. Pasado este tiempo, se añadió la misma cantidad de TEMPO y de lacasa que el día que se puso la reacción, ambos disueltos en un mismo volumen (1 mL) de ciclohexano y tampón citrato pH 5, respectivamente.

Después de 24 horas, se adicionaron 2 mL de tampón carbonato pH 10 y 10 equivalentes de MeNO₂. Se volvió a introducir el vial en el incubador con agitación orbital y se dejó reaccionando durante 17 horas, tras las cuales se realizó la extracción de la fase orgánica con AcOEt, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna en silica gel (eluyente AcOEt:Hexano 15:85, aunque posteriormente se aumentó la polaridad para facilitar la salida del producto) para obtener el correspondiente nitroalcohol **5** como un aceite incoloro (67 mg, 63% rendimiento global). Se realizaron otros ensayos con diferentes cantidades de reactivos y disolventes, en función de la cantidad disponible de sustrato, pero manteniendo la misma proporción que en el ensayo descrito.

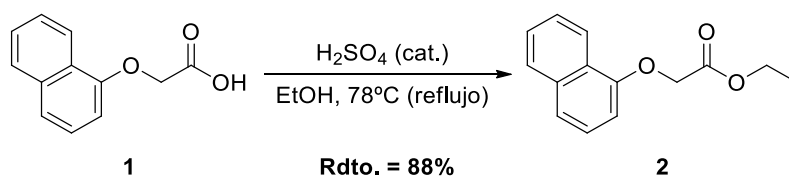
4. Resultados y discusión

4.1 Síntesis química del alcohol de partida

4.1.1 Esterificación de Fischer

La esterificación de Fischer consiste en la formación de un éster por reacción de un ácido carboxílico y un alcohol primario o secundario a reflujo, en presencia de un catalizador ácido. El mecanismo de reacción puede resumirse en: protonación del grupo carbonilo del ácido, adición del alcohol al C carbonílico y deshidratación para generar el correspondiente éster (14).

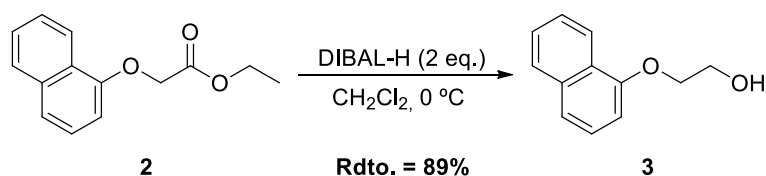
En este caso, el sustrato de la reacción es el ácido 2-(naftalen-1-iloxi)acético **1**, el cual se hizo reaccionar con etanol en presencia de ácido sulfúrico. El etanol actúa como reactivo y como disolvente. La reacción transcurrió a reflujo, por lo que la temperatura empleada es la de ebullición del etanol ($T_{eb} = 78^{\circ}\text{C}$). Se dejó reaccionar durante 24 horas y, tras la extracción, se obtuvo el producto **2** sin necesidad de purificación con un rendimiento aislado del 88%.



Esquema 5. Esterificación del ácido 2-(naftalen-1-iloxi)acético.

4.1.2 Reducción de **2** con DIBAL-H para la obtención del alcohol primario **3**

Con el objetivo de obtener el alcohol **3**, se hizo reaccionar el 2-(naftalen-1-iloxi)acetato de etilo **2** con 2 equivalentes de DIBAL-H (hidruro de diisobutilaluminio) a 0°C. Dado que el DIBAL-H puede reaccionar con agua para formar sales de aluminio y el aire contiene vapor de agua, la reacción transcurrió bajo atmósfera inerte (Ar). Se dejó reaccionar durante 24 horas y, tras la extracción y purificación por cromatografía en columna, se obtuvo el alcohol primario **3** con un rendimiento aislado del 89%.

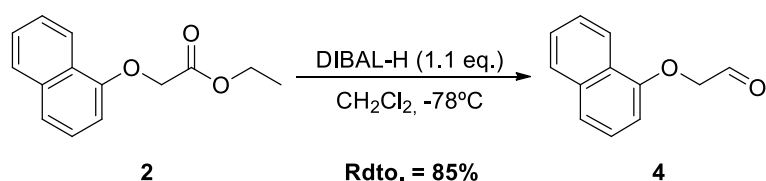


Esquema 6. Reducción del éster **2** con DIBAL-H para la obtención del alcohol **3**.

Se eligió el DIBAL-H como compuesto reductor debido a que es menos reactivo que el LiAlH_4 y permite obtener de forma selectiva bien el aldehído o bien el alcohol variando las condiciones de temperatura y los equivalentes de DIBAL-H. Es menos reactivo porque, al contrario que el LiAlH_4 , se trata de un compuesto covalente (los grupos diisobutil están unidos covalentemente al átomo de Al), haciendo que el hidruro sea menos reactivo. El DIBAL-H es un agente reductor electrofílico que se utiliza generalmente en cantidades estequiométricas para reducir ésteres o nitrilos a aldehídos a temperaturas alrededor de -78°C (a diferencia de reductores fuertes como LiAlH_4 , que reducen los ésteres hasta alcoholes primarios) (15,16). El primer paso en el mecanismo de reacción del DIBAL-H consiste en la coordinación del O carbonílico con el átomo de Al del DIBAL-H. Una vez formado el complejo, se transfiere el hidruro al C carbonílico para dar un hemiacetal estable a temperaturas bajas. Con la adición final de agua se produce la formación del aldehído (15,17).

Es frecuente que en las reducciones de ésteres con DIBAL-H se produzcan mezclas del alcohol y el aldehído (16). En nuestra experiencia, dejar que la reacción transcurra a temperatura ambiente con un exceso de DIBAL-H conduce a la formación mayoritaria del alcohol. Esto se debe a que los aldehídos son especies mucho más reactivas que los ésteres, por lo que cuando hay un exceso de hidruro, se forma el alcohol.

Además de la producción del alcohol, se obtuvo el aldehído intermedio **4** para proceder a su correcta caracterización previa a los ensayos de oxidación enzimática. Para ello se hizo reaccionar 2-(naftalen-1-iloxi)acetato de etilo **2** bajo atmósfera inerte con 1.1 equivalentes de DIBAL-H a -78°C . Se siguió el mismo protocolo de purificación que en el caso del alcohol **3**, y finalmente se obtuvo el aldehído **4** con un rendimiento aislado del 85%.



Esquema 7. Reducción del éster **2** con DIBAL-H para la obtención del aldehído **4**.

4.2 Oxidación enzimática con la lacasa de *Trametes versicolor*

Las lacasas son enzimas que se encuentran en una gran variedad de hongos, plantas y bacterias. Pertenecen al grupo de las oxidasas de cobre azul porque poseen cuatro átomos de cobre en su estructura que le permiten oxidar sustratos fenólicos o aminas aromáticas a sus correspondientes aldehídos. Para la oxidación de compuestos no fenólicos se requiere un mediador que, tras ser oxidado por la lacasa, acepte un electrón del sustrato no natural para que este se oxide (18,19). Los mediadores más utilizados en las oxidaciones con lacasas son ABTS, HBT, HPI y TEMPO, siendo este último el más estudiado (18,20).

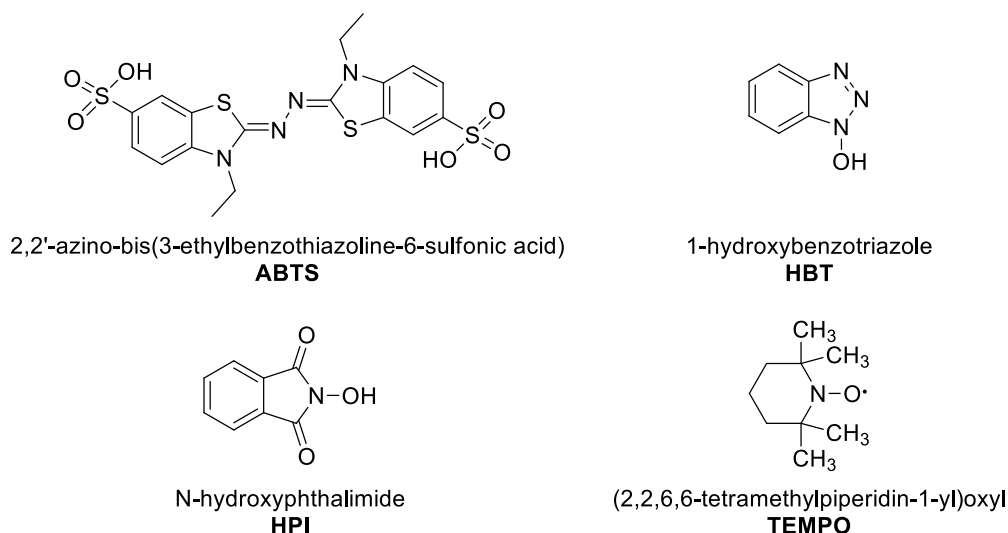
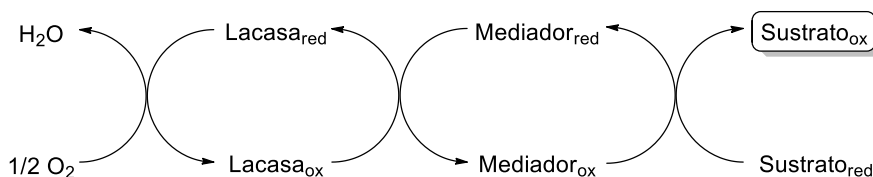


Figura 3. Estructura de los mediadores de la oxidación más comunes.

Los cuatro átomos de cobre de las lacasas se encuentran en tres sitios redox: T1, T2 y T3 (en este último hay dos átomos de cobre). El sitio T1 acepta $1 e^-$ del mediador y posteriormente lo transfiere a los sitios T2 y T3, posiblemente por medio de una tríada His-Cys-His muy conservada. Los tres átomos de cobre que conforman los sitios T2 y T3 se encuentran muy próximos entre sí, por lo que actúan funcionalmente como un único sitio en el que el oxígeno molecular se reduce a agua (con la formación transitoria de un intermedio peróxido) (21).



Esquema 8. Mecanismo de transferencia de electrones en un sistema lacasa/mediador (18,22).

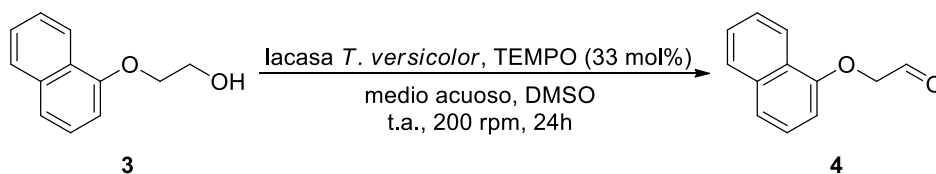
En este trabajo se ha utilizado la lacasa del hongo *Trametes versicolor* (≥ 0.84 U/mg) y TEMPO como mediador. Se estudiaron los efectos de distintos parámetros sobre la conversión.

4.2.1 Efecto del tampón

Para la elección del medio de reacción hay que tener en cuenta que el pH óptimo de esta lacasa se encuentra alrededor de 5, por lo que se eligieron dos disoluciones tampón basándonos en trabajos anteriores en donde se describen procesos similares: un tampón citrato pH 5 50 mM y un tampón acetato pH 5 100 mM (18–20).

En este ensayo se utilizó un pequeño volumen de DMSO (aproximadamente un 10% del volumen final) para solubilizar el 2-(naftalen-1-iloxi)etanol **3** y 0.33 equivalentes de TEMPO (33 mol%). Por otro lado, se disolvieron 5 U de lacasa en las dos disoluciones tampón pH 5 diferentes y finalmente se mezclaron las disoluciones con el sustrato y con la enzima en viales para que se produzca la reacción. La reacción se llevó a cabo con el vial abierto ya que la reacción requiere O_2 como aceptor final de electrones, aunque el disolvente se evaporó a las pocas horas y se tuvo que añadir de nuevo DMSO y el tampón pH 5 correspondiente. Se

dejaron reaccionar a temperatura ambiente con agitación mecánica durante 24 horas. Las conversiones se calcularon mediante ^1H -RMN.



Esquema 9. Ensayo de distintos tampones pH 5 en la oxidación catalizada por la lacasa de *T. versicolor*.

ID	Medio acuoso	Conversión (%)
SP-5	Tampón citrato pH 5	20
SP-6	Tampón acetato pH 5	13

Tabla 2. Efecto de las dos disoluciones tampón pH 5 sobre la conversión.

La conversión que se obtuvo en la reacción con el tampón citrato es ligeramente superior a la que se obtuvo con el tampón acetato (20% frente a 13%), por lo que se decidió utilizar el tampón citrato pH 5 en las sucesivas reacciones.

A continuación se muestra un ejemplo de cómo se calcula la conversión por ^1H -RMN.

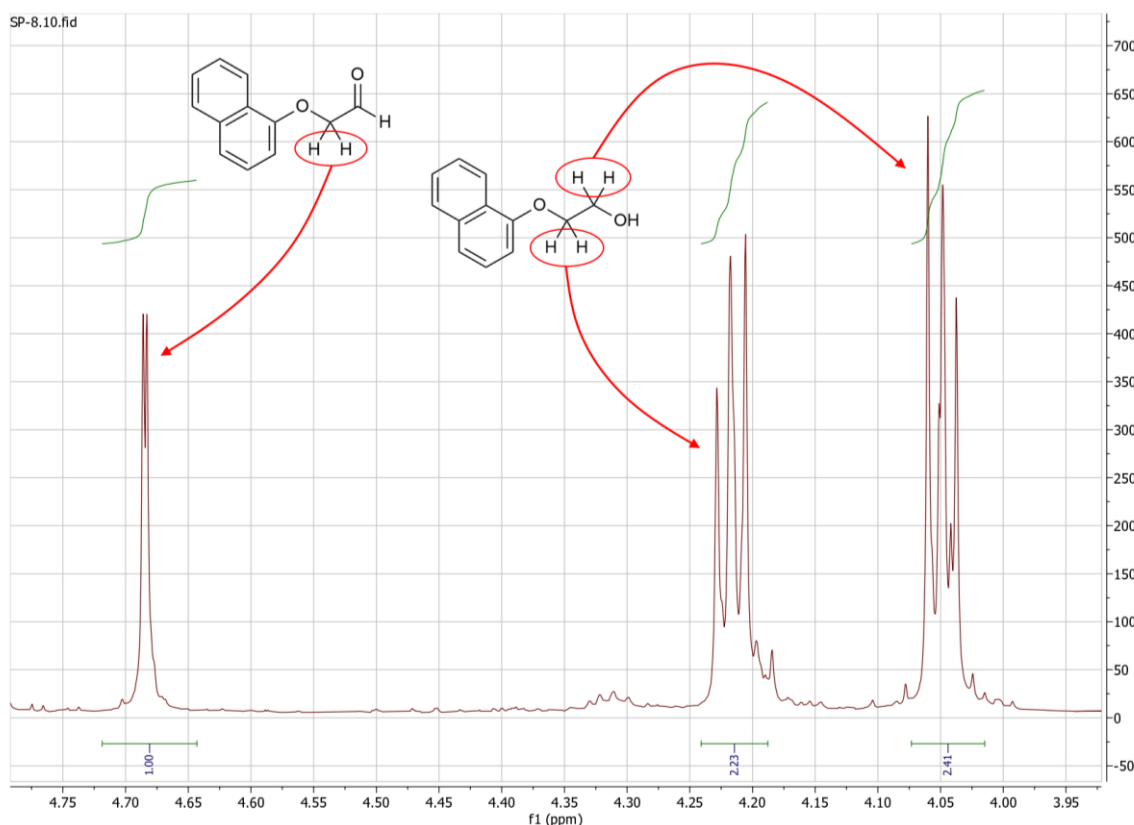


Figura 4. Zona del espectro ^1H -RMN en la que se encuentran las señales utilizadas para calcular la conversión en las reacciones de oxidación enzimática.

Para el cálculo de la conversión, se utilizaron dos señales en el espectro que corresponden a los mismos ^1H en el aldehído y en el alcohol. En el alcohol, los dos ^1H utilizados están representados como un triplete porque se encuentran acoplados con otros dos ^1H , mientras

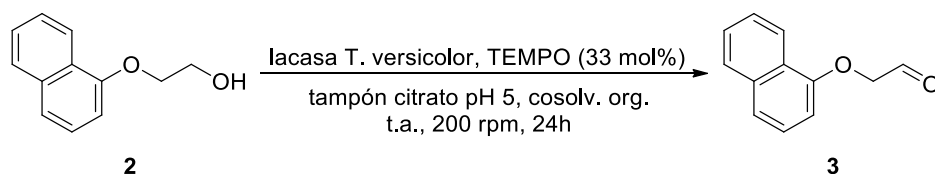
que en el aldehído observamos un doblete, ya que están acoplados con el ^1H del grupo funcional $-\text{CHO}$. Esto nos permite diferenciar cuáles pertenecen al alcohol y cuáles al aldehído, y utilizar los valores de integración para calcular la conversión de la siguiente forma:

$$\text{Conversión (\%)} = \frac{\text{int. aldehído}}{\text{int. alcohol} + \text{int. aldehído}} \cdot 100 = \frac{1.00}{2.23 + 1.00} \cdot 100 = 31\%$$

Otra forma de calcular la conversión sería utilizando señales correspondientes a la zona de los ^1H aromáticos, debido a que el desplazamiento es ligeramente diferente en el alcohol y en el aldehído.

4.2.2 Efecto del cosolvente

Dado que el 2-(naftalen-1-iloxi)etanol **2** no es soluble en agua, se ensayaron distintos cosolventes orgánicos con el objetivo de aumentar la conversión. Estos fueron: DMSO (dimetilsulfóxido), ciclohexano, THF (tetrahidrofurano), acetonitrilo y TBME (tert-butil metil éter). Se prepararon reacciones con el tampón citrato pH 5 y cada uno de los cosolventes orgánicos en relación 1:1 (v/v). De nuevo se utilizaron 0.33 equivalentes de TEMPO y 5 U de enzima. Se dejaron reaccionar a temperatura ambiente con los viales abiertos y con agitación mecánica durante 24 horas.



Esquema 10. Ensayo de distintos cosolventes en la oxidación catalizada por la lacasa de *T. versicolor*.

ID	Cosolvente	Conversión (%)
SP-7	DMSO	< 3
SP-8	Ciclohexano	31
SP-9	THF	< 3
SP-10	Acetonitrilo	< 3
SP-14	TBME	13

Tabla 3. Efecto de los cosolventes orgánicos ensayados sobre la conversión.

La importancia de elegir un buen cosolvente reside, *a priori*, en su capacidad de solubilizar el alcohol, ya que este apenas es soluble en un medio acuoso, lo que condiciona que la reacción ocurra en la interfase entre la fase acuosa y la fase orgánica, donde se puede dar el encuentro entre la enzima y el sustrato.

Las reacciones SP-7, SP-9 y SP-10 presentan una conversión inferior al 3% (debido al límite de detección de la técnica empleada, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, la mínima conversión que se puede calcular es del 3%). La reacción en la que se ha obtenido una mayor conversión es SP-8 (31%), por lo que se decidió utilizar ciclohexano como cosolvente en las siguientes reacciones. A pesar de que el sustrato presenta una menor solubilidad en ciclohexano que en otros cosolventes orgánicos como TBME, se obtiene una

conversión superior. Se esperaba obtener conversiones más altas con cosolventes como DMSO y TBME por su capacidad para solubilizar mejor el alcohol **3**.

4.2.3 Efecto de la proporción de cosolvente

Una vez elegido el cosolvente, se procedió a la determinación de la cantidad óptima. Para ello, se prepararon reacciones con un 30% y con un 70% de cosolvente (v/v) y se dejaron reaccionar a temperatura ambiente con agitación mecánica durante 24 horas. Las conversiones de las reacciones se calcularon mediante ^1H -RMN.

ID	Medio acuoso - Cosolvente	Relación (v/v)	Conversión (%)
SP-8	Tampón citrato pH 5 - Ciclohexano	1:1	31
SP-21	Tampón citrato pH 5 - Ciclohexano	3:7	18
SP-22	Tampón citrato pH 5 - Ciclohexano	7:3	< 3

Tabla 4. Efecto de la proporción de cosolvente sobre la conversión.

No se observó una mayor conversión en las reacciones con un 30% y un 70% de cosolvente, por lo que se decidió seguir utilizando un 50% de cosolvente en las sucesivas reacciones (la conversión de SP-8 es superior).

4.2.4 Efecto de la temperatura, agitación y presencia de Cu^{2+}

Tras realizar la optimización del disolvente y cosolvente, se procedió al estudio de otros parámetros de reacción que pueden tener influencia en el proceso, como la temperatura, el tipo de agitación y la presencia de Cu^{2+} . Por ejemplo, la agitación vigorosa puede tener un efecto negativo sobre la estructura de la lacasa (desnaturalización y pérdida de actividad). Asimismo, la temperatura puede tener influencia ya que hay una relación directa entre la temperatura y la cinética de reacción, además de ayudar a solubilizar los compuestos en el medio de reacción. Además, se estudió el efecto del ion Cu^{2+} en la reacción. Como se ha comentado anteriormente, el cobre forma parte de la estructura de las lacasas y es necesario para catalizar la oxidación del mediador. Para la expresión de lacasas en el microorganismo correspondiente, se utiliza una concentración baja de iones Cu^{2+} (añadiendo, por ejemplo, sulfato de cobre al medio) para facilitar la incorporación de cobre en la estructura de la apoproteína y que se produzca la estabilización estructural y la activación catalítica de la enzima. Sin embargo, puede haber problemas en la incorporación de cobre en la apoproteína, especialmente cuando se lleva a cabo la expresión recombinante de lacasas en hospedadores como *Escherichia coli* (23).

Para el estudio de la influencia de Cu adicional, se llevaron a cabo las siguientes reacciones, usando CuSO_4 como fuente de Cu^{2+} :

- 1) Ciclohexano sin Cu^{2+} a temperatura ambiente
- 2) Ciclohexano con Cu^{2+} a temperatura ambiente
- 3) Ciclohexano con Cu^{2+} sin enzima a temperatura ambiente (control negativo)
- 4) TBME sin Cu^{2+} a temperatura ambiente
- 5) TBME con Cu^{2+} a temperatura ambiente
- 6) Ciclohexano sin Cu^{2+} con agitación orbital a 30°C

Para las reacciones que contienen cobre: 40% tampón citrato pH 5, 10% disolución de CuSO₄ y 50% cosolvente orgánico (v/v). Para las reacciones sin cobre: 50% tampón citrato pH 5 y 50% cosolvente orgánico (v/v). Se utilizaron 0.33 equivalentes de TEMPO y 5 U de enzima.

ID	Cosolvente	Enzima	Temperatura	Agitación	Cu ²⁺	Conversión (%)
SP-11	Ciclohexano	Sí	Amb.	Mecánica	No	30
SP-12	Ciclohexano	Sí	Amb.	Mecánica	Sí	3
SP-13	Ciclohexano	No	Amb.	Mecánica	Sí	0
SP-14	TBME	Sí	Amb.	Mecánica	No	13
SP-15	TBME	Sí	Amb.	Mecánica	Sí	13
SP-16	Ciclohexano	Sí	30°C	Orbital	No	42

Tabla 5. Efecto de la temperatura, tipo de agitación y presencia de Cu²⁺ sobre la conversión.

Comparando la conversión obtenida en las reacciones SP-11 y SP-12, se pudo determinar que el ion Cu²⁺ ejerce un efecto inhibitorio sobre la lacasa de *T. versicolor* (se observó una reducción en la conversión de casi el 90%). Esta observación concuerda con otros trabajos en los que se detectó una inhibición significativa utilizando concentraciones de Cu²⁺ superiores a 2 mM (24). Como se esperaba, en el control sin enzima (reacción SP-13) no se obtuvo conversión, por lo que se pudo determinar que el ion Cu²⁺ no tiene capacidad para catalizar la oxidación por sí mismo. Al contrario que la presencia del ion Cu²⁺, se observó que un aumento de la temperatura (30°C) en combinación con agitación orbital tuvo como consecuencia un aumento de la conversión (42% en la reacción SP-16). Por ello, se decidió utilizar estas condiciones como punto de partida en el posterior escalado.

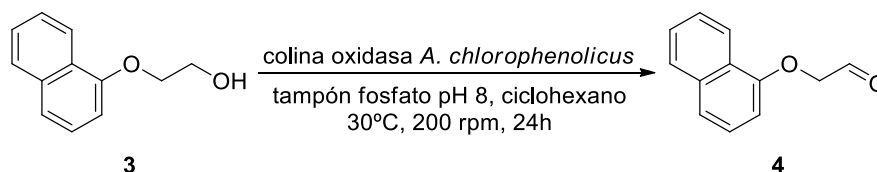
Respecto a las reacciones SP-14 y SP-15, no se observaron diferencias en la conversión, por lo que no se pudo concluir que el ion Cu²⁺ tuviera un efecto negativo como en las reacciones en las que se utilizó ciclohexano como cosolvente. Además, es importante señalar que las reacciones SP-8 y SP-11, realizadas bajo las mismas condiciones, presentan valores de conversión similares, por lo que esta reacción es reproducible.

4.3 Oxidación enzimática con la alcohol oxidasa de *Arthrobacter chlorophenolicus*

Una alternativa para la oxidación del 2-(naftalen-1-iloxi)etanol **3** ensayada en este trabajo es el uso de la colina oxidasa de *Arthrobacter chlorophenolicus* modificada y expresada en *E. coli*. Esta enzima, que tiene FAD como cofactor, fue modificada por evolución dirigida para obtener una variante capaz de transformar un amplio rango de alcoholes primarios. Además, esta variante es más estable a temperaturas altas y se observó que la conversión mejoraba al utilizar algunos cosolventes orgánicos al 50% v/v (25).

En este caso no disponíamos de la enzima purificada, sino de dos lisados celulares liofilizados (cell free extract, CFE) en los que se encuentra la colina oxidasa sobreexpresada, uno de ellos preparado por la empresa Prozomix Ltd. y otro por el grupo del profesor Nicholas Turner de la Universidad de Manchester. Se estudió la oxidación con dos sustratos, por un lado el 2-(naftalen-1-iloxi)etanol **3** y por otro el alcohol cinámico, que se utilizó como control positivo, ambos disueltos en ciclohexano a una concentración final de 50 mM. Se mezclaron con un

mismo volumen de una disolución del lisado celular (6 mg/mL) en tampón fosfato pH 8 y se dejaron reaccionar a 30°C en agitación orbital a 200 rpm durante 24 horas.



Esquema 11. Oxidación del 2-(naftalen-1-iloxi)etanol **3** catalizada por la colina oxidasa de *Arthrobacter chlorophenolicus* modificada.

En los ensayos de la colina oxidasa con el sustrato de interés no se observó la formación del aldehído **4**, ni con el CFE de Prozomix Ltd. ni con el del grupo del profesor Nicholas Turner de la Universidad de Manchester. En los controles positivos de la oxidación enzimática del alcohol cinamílico sí se observó la formación de producto.

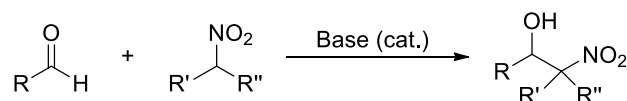
Como control positivo se decidió usar alcohol cinamílico ya que de los sustratos ensayados en el artículo en el que se explica la modificación y ensayo de la colina oxidasa empleada (25) es el más parecido a nuestro sustrato. En este trabajo, dicho sustrato se ensayó en unas condiciones idénticas a las nuestras y se obtuvo una conversión superior al 75%. Estos controles sirven también para comprobar que la capacidad catalítica de la colina oxidasa presente en cada uno de los CFE es similar debido a que encontramos bandas de tamaños muy parecidos al estudiar cualitativamente la conversión por cromatografía en capa fina.

Teniendo en cuenta el rango de alcoholes primarios ensayados por *R. Heath et al.* (25) y las diferencias estructurales que existen entre ellos y nuestro sustrato de interés (ninguno de ellos posee un átomo de oxígeno en su cadena ni un biciclo compuesto por dos anillos de benceno fusionados), es posible que la razón por la que no se observa conversión del 2-(naftalen-1-iloxi)etanol **3** sea que existen impedimentos estéricos que imposibilitan su acceso al sitio activo de la enzima.

Como no se observó conversión empleando la colina oxidasa de *A. chlorophenolicus*, se decidió seguir utilizando la lacasa de *T. versicolor*.

4.4 Estudio de la reacción de Henry catalizada por lipasas

La reacción de Henry consiste en la formación de β-nitroalcoholes a partir de un nitroalcano y un aldehído o cetona en presencia de una base que cataliza la reacción. Esta reacción se conoce también como condensación nitroaldólica. Por lo general, la reacción de Henry da una mezcla de diastereoisómeros y enantiómeros (26,27). Además, el uso de bases fuertes como el hidróxido de sodio y el metóxido de sodio conduce a la formación de productos indeseados debido a que estas bases pueden catalizar reacciones competitivas como la adición aldólica, la reacción de Cannizzaro y la eliminación de agua (28).



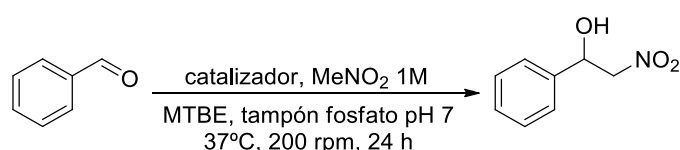
Esquema 12. Esquema general de la reacción de Henry.

Las lipasas son enzimas cuya función fisiológica es catalizar la hidrólisis de los enlaces éster de los acilglicerolos para dar ácidos grasos y glicerol. Son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran en animales, plantas y microorganismos. En biocatálisis se utilizan en reacciones de hidrólisis y esterificación para generar alcoholes, ácidos carboxílicos y ésteres, generalmente con una elevada estereoselectividad. Otra aplicación de las lipasas es la resolución cinética de intermedios quirales como alcoholes secundarios y aminas, además de catalizar algunas reacciones de formación de enlaces C-C como actividad promiscua de forma inespecífica (29). Esta última es la aplicación que nos interesa en este trabajo.

Se ensayaron la albúmina de suero bovino (BSA) y tres lipasas diferentes con el objetivo de estudiar su capacidad de formación del β -nitroalcohol a partir de nitrometano y el aldehído correspondiente así como la estereoselectividad de la reacción. Para este ensayo se utilizó benzaldehído como sustrato por cuestiones de disponibilidad comercial. La idea era poder determinar si se produce una catálisis específica o inespecífica y, posteriormente aplicar esta reacción al sustrato proveniente de la oxidación enzimática, el 2-(naftalen-1-iloxi)acetaldehído 4.

En primer lugar, se ensayó BSA, que no es una lipasa pero puede presentar cierta actividad catalítica inespecífica y su posible uso como biocatalizador se encuentra en estudio. En segundo lugar, se ensayó CAL-B comercial (3367 U/g) producida de forma recombinante en *Aspergillus oryzae* e inmovilizada. En tercer lugar, se ensayó una lipasa comercial de *Burkholderia cepacia* (≥ 30000 U/g), la Amano lipase PS. Por último, se ensayó una lipasa de *Aspergillus niger*, de nombre comercial Amano lipase A (≥ 120000 U/g).

Se prepararon reacciones con distinta proporción en volumen de TBME y tampón fosfato pH 7: 100% TBME, 90% TBME + 10% tampón, 70% + 30% tampón y 50% TBME + 50% tampón. Las disoluciones se prepararon de forma que la concentración final de benzaldehído fuera 50 mM. También se realizaron controles con las mismas proporciones de TBME y tampón fosfato pH 7, pero sin proteína. Finalmente se adicionó MeNO₂ hasta una concentración final de 1 M. Se dejaron reaccionar a 37°C durante 24 horas en agitación orbital a 200 rpm.



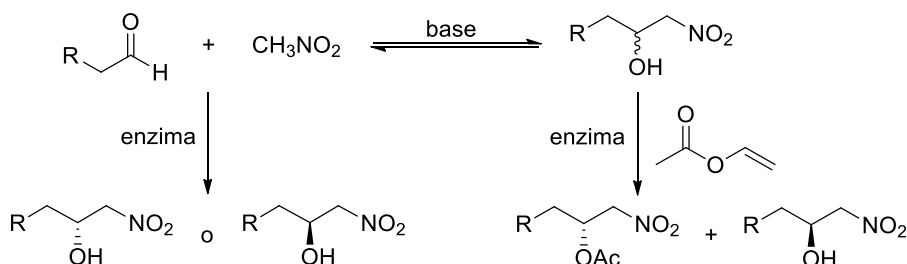
Esquema 13. Ensayo de varios catalizadores en la reacción de Henry.

En la medida cualitativa de la producción del β -nitroalcohol por cromatografía en capa fina se observó una conversión significativa al utilizar TBME y tampón fosfato pH 7 en relación 1:1 (v/v), tanto con BSA como en el control sin proteína, siendo mayor en este último. La conversión era menor en las reacciones en las que se utilizó una mayor proporción de TBME. En el caso de las tres lipasas, la conversión era muy baja y también disminuía conforme aumentaba la proporción de TBME. El hecho de que la conversión fuera mayor en el control que con cualquiera de las proteínas ensayadas indica que estas no son necesarias para la formación del producto.

Existe cierta controversia acerca del mecanismo por el que se produce la reacción de Henry catalizada por enzimas. Se ha propuesto que esta pueda ocurrir por la promiscuidad de ciertas enzimas como algunas lipasas (30), pero otros autores sugieren que podría suceder mediante

catálisis inespecífica (28). En el caso de que la reacción ocurra por la promiscuidad de las lipasas, es decir, que aceptaran en su centro activo sustratos diferentes de los naturales y los transformaran en el β -nitroalcohol correspondiente, estaríamos hablando de una catálisis específica y se obtendría preferentemente uno de los enantiómeros. Si, por el contrario, la catálisis se produce por residuos que no forman parte del centro activo, se trataría de una catálisis inespecífica y se obtendría el producto racémico. Es por esto por lo que se decidió ensayar una proteína no enzima como BSA (sin actividad catalítica específica al carecer de centro activo) y tres lipasas diferentes, además de realizar controles sin enzima.

Por otro lado, hay dos mecanismos por los que se puede obtener mayoritariamente uno de los enantiómeros del β -nitroalcohol y que se produzca uno u otro depende de la enzima ensayada: reacción de Henry de forma directa catalizada por la enzima o reacción de Henry catalizada por una base seguida de una resolución enzimática (31).

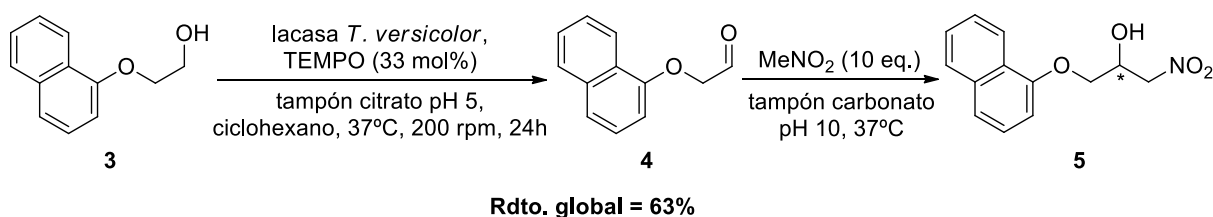


Esquema 14. Aproximaciones para obtener β -nitroalcoholes con una elevada estereoselectividad.

A la vista de los resultados, se pudo concluir que la catálisis llevada a cabo por la BSA y las tres lipasas es inespecífica y se forma el β -nitroalcohol racémico. Como se ha comentado anteriormente, la reacción de Henry requiere una base que actúe como catalizador. Este papel lo realizan los aminoácidos básicos expuestos en la superficie de las proteínas ensayadas, especialmente los residuos de lisina, que suelen predominar frente a otros aminoácidos básicos. Se decidió realizar el escalado únicamente utilizando un medio básico (tampón carbonato pH 10) y nitrometano.

4.5 Escalado para la obtención del β -nitroalcohol racémico mediante combinación en cascada de la oxidación enzimática y la reacción de Henry

Finalmente, se realizó un escalado del proceso de forma secuencial para la obtención del β -nitroalcohol racémico. Para ello, se llevó a cabo la oxidación enzimática del alcohol **3** catalizada por la lacasa de *T. versicolor* en las condiciones en las que se obtuvieron una mayor conversión y rendimiento. Posteriormente, y sin necesidad de purificar el aldehído **4**, se añadió tampón carbonato pH 10 y MeNO₂ para que se produjera la reacción de Henry y obtener el β -nitroalcohol **5**.



Esquema 15. Oxidación y reacción de Henry en cascada para la obtención del β -nitroalcohol racémico.

Tras varios ensayos en los que no se consiguió aislar el nitroalcohol **5**, finalmente se pudo obtener con un rendimiento global del 63%. A pesar de que la mayor conversión obtenida en la oxidación enzimática fue del 42%, la adición de lacasa y TEMPO 24 horas después del inicio de la reacción, cuando probablemente gran parte de la enzima se había desnaturalizado ya, permitió aumentar la conversión y obtener así una mayor cantidad de aldehído **4**. Este producto intermedio reaccionó con nitrometano en medio básico para dar de forma mayoritaria el β -nitroalcohol racémico **5**.

La combinación de estas dos reacciones en cascada es interesante no solo por evitar pasos de purificación y reducir la generación de residuos, sino también porque el producto intermedio es un aldehído, los cuales son muy reactivos y difíciles de almacenar. Por ello, hacerlo reaccionar rápidamente al producto **5** supone una ventaja.

Aunque pueda resultar de mayor interés comercial el enantiómero *S* del β -nitroalcohol producido para poder llegar al (*S*)-propranolol, sería interesante poder producir también el enantiómero *R*, ya que su uso como posible anticonceptivo (espermicida) y también como agente anti-angiogénico (para el tratamiento de algunas enfermedades vasculares) se encuentra en estudio (32,33). Una vez obtenida la mezcla racémica, los enantiómeros podrían ser separados en caso de resultar rentable y se podría administrar solamente (*S*)-propranolol como tratamiento β -bloqueante y reducir así la dosis necesaria para conseguir el mismo efecto.

5. Conclusiones

Se puede concluir que, mediante los distintos experimentos realizados en este Trabajo de Fin de Grado, se han cumplido en gran medida los objetivos propuestos inicialmente. El siguiente paso hubiera consistido en estudiar la resolución cinética del nitroalcohol racémico obtenido en el escalado para conseguir ambos enantiómeros por separado. Posteriormente, en caso de haber dispuesto de más tiempo, se hubiera sintetizado el propranolol realizando, en primer lugar, una reducción del grupo NO_2 del β -nitroalcohol **5** y posteriormente una alquilación o aminación reductora usando acetona y un agente reductor.

En la síntesis química del sustrato de la oxidación enzimática se obtuvo un rendimiento elevado (79% rendimiento global), que podría mejorarse mediante otras técnicas de purificación o mediante la automatización del proceso, en el caso de que nos encontráramos en un entorno industrial.

Mediante la oxidación enzimática del alcohol **3** catalizada por la lacasa de *Trametes versicolor* se consiguieron valores de conversión aceptables en las condiciones elegidas para realizar el escalado. Además, aumentó al añadir de nuevo lacasa y TEMPO (mediador de la oxidación) tras 24 horas de reacción. Para mejorar la conversión de esta reacción sería necesario realizar más ensayos con diferentes temperaturas o variando los equivalentes de TEMPO. Por otro lado, se determinó que la colina oxidasa modificada de *Arthrobacter chlorophenolicus* no cataliza la oxidación del alcohol **3**, posiblemente debido a impedimentos estéricos que imposibilitan su acceso al centro activo de la enzima. Se podría ensayar otras alcohol oxidasas o incluso obtener una nueva variante por evolución dirigida con este propósito en concreto.

En el ensayo de la reacción de Henry catalizada por BSA/lipasas se concluyó que la reacción ocurre por catálisis inespecífica y no por la promiscuidad de las lipasas. Además, se observó

que la conversión era mayor en los controles sin proteína, por lo que se desestimó la idea de utilizarlas en el escalado.

Finalmente, en el escalado, se obtuvo un rendimiento global del 63%. El aumento de la conversión y del rendimiento depende en gran parte de encontrar las condiciones óptimas de las reacciones combinadas en cascada: la oxidación enzimática y la reacción de Henry.

Se consideraron otras rutas de síntesis biocatalítica del propranolol, como la síntesis a partir de glicerol, a partir de 1-naftol y 3-bromopropeno, o mediante el uso de reductasas de ácidos carboxílicos (CARs) para alcanzar la formación del aldehído intermedio **4** a partir del ácido carboxílico comercial **1**. La primera de ellas se descartó porque en el primer paso se requeriría una oxidasa modificada para catalizar la oxidación selectiva de uno de los grupos hidroxilo. Aunque, por otro lado, presenta la ventaja de que el glicerol es un compuesto abundante y de bajo coste económico que se puede obtener como material de desecho. La segunda y tercera síntesis propuesta se descartaron ya que las enzimas necesarias en pasos clave no están disponibles actualmente en el grupo de investigación. Es por esto por lo que se decidió llevar a cabo la ruta biocatalítica planteada en los objetivos.

Conclusions

It can be concluded that, by means of the different experiments carried out in this Bachelor Thesis, the initially proposed objectives have been met to a large extent. The next step would have been the study of the kinetic resolution of the racemic nitroalcohol obtained in the scale-up to produce both enantiomers separately. If more time had been available, propranolol would have been synthesised by firstly reducing the NO₂ group of β -nitroalcohol **5** and then the final product could have been accessed by either alkylation or reductive amination using acetone and a reducing agent.

Regarding the chemical synthesis of the enzymatic oxidation substrate, a high yield was obtained (79% overall yield), which could be improved by other purification techniques or by automating the process if we were in an industrial environment.

By enzymatic oxidation of alcohol **3** catalysed by laccase from *Trametes versicolor*, acceptable conversion values were achieved under the conditions chosen for scale-up. Furthermore, it increased with the addition of laccase and TEMPO (oxidation mediator) after 24 hours of reaction. Further tests with different temperatures or varying TEMPO equivalents would be necessary to improve the conversion of this reaction. On the other hand, it was determined that the modified choline oxidase from *Arthrobacter chlorophenolicus* does not catalyse the oxidation of alcohol **3**, possibly due to steric hindrance that prevents its access to the active centre of the enzyme. Other alcohol oxidases could be tested or even a new variant could be obtained by directed evolution for this particular purpose.

In the BSA/lipase-catalysed Henry reaction assay, it was concluded that the reaction occurs by non-specific catalysis and not by promiscuity of the lipases. Furthermore, it was observed that the conversion was higher in the controls without protein, so the idea of using them in the scale-up was discarded.

Finally, in the scale-up, an overall yield of 63% was achieved. The increase in conversion and yield depends largely on finding the optimal conditions for the combined cascade reactions: enzymatic oxidation and Henry's reaction.

Other biocatalytic synthesis routes for propranolol were considered, such as the synthesis starting from glycerol, from 1-naphthol and 3-bromopropene, or by using carboxylic acid reductases (CARs) to access the intermediate aldehyde **4** from the commercial carboxylic acid **1**. The former was discarded because the first step would require a modified oxidase to catalyse the selective oxidation of a single hydroxyl group. Nevertheless, it has the advantage of glycerol being an abundant and inexpensive compound that can also be obtained from waste materials. The second and third proposed syntheses were discarded as the enzymes required for key steps are currently not available in our research group. Therefore, it was decided to carry out the biocatalytic route proposed in the objectives.

6. Bibliografía

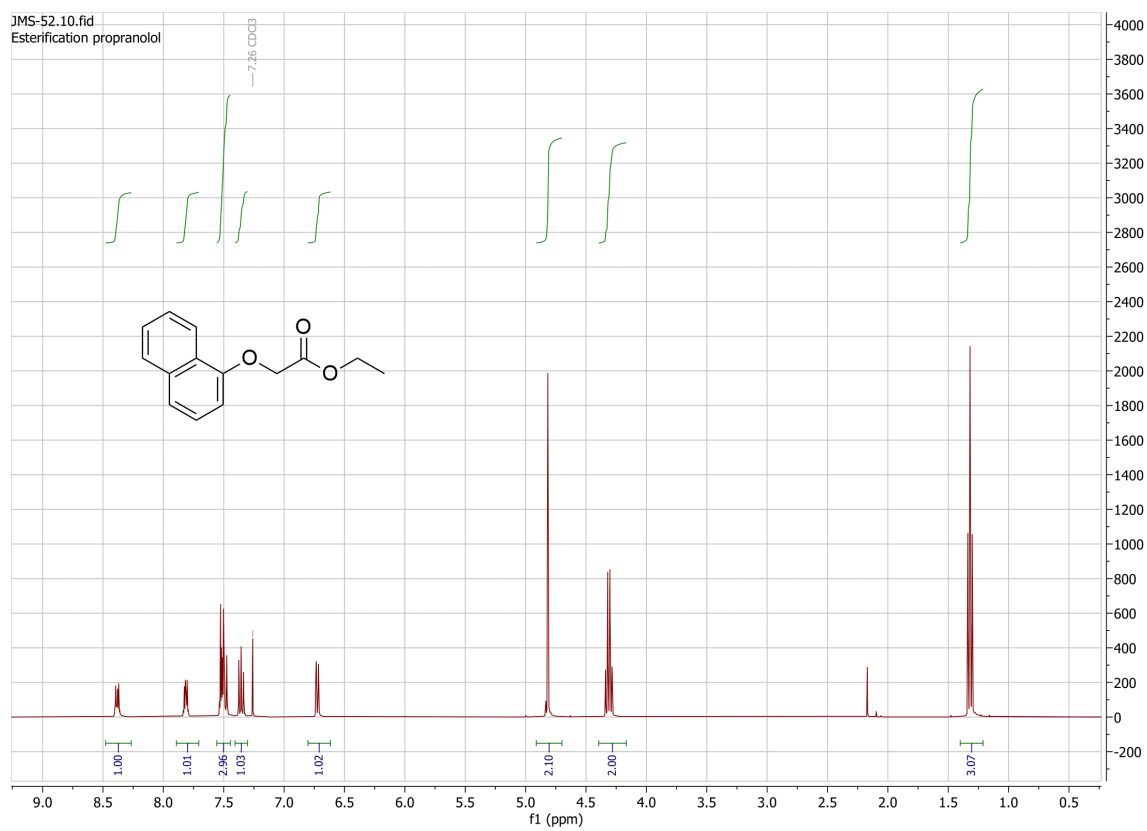
1. Sheldon RA, Brady D. The limits to biocatalysis: Pushing the envelope. *Chem Commun.* 2018;54(48):6088–104.
2. Wu S, Snajdrova R, Moore JC, Baldenius K, Bornscheuer UT. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. *Angew Chemie - Int Ed.* 2021;60(1):88–119.
3. Hughes DL. Biocatalysis in Drug Development - Highlights of the Recent Patent Literature. *Org Process Res Dev.* 2018;22(9):1063–80.
4. Mangas-sanchez J, Cosgrove SC, Turner NJ. Application of engineered biocatalysts for the synthesis of active pharmaceutical ingredients (APIs).
5. Adams JP, Brown MJB, Diaz-Rodriguez A, Lloyd RC, Roiban GD. Biocatalysis: A Pharma Perspective. *Adv Synth Catal.* 2019;361(11):2421–32.
6. Huffman MA, Fryszkowska A, Alvizo O, Borra-Garske M, Campos KR, Canada KA, et al. Design of an in vitro biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir. *Science* (80-). 2019;366(6470):1255–9.
7. Al-Majed AA, Bakheit AHH, Abdel Aziz HA, Alajmi FM, AlRabiah H. Propranolol. *Profiles Drug Subst Excipients Relat Methodol.* 2017;42:287–338.
8. Vardanyan RS, Hruby VJ. Adrenoblocking Drugs. *Synth Essent Drugs.* 2006;161–77.
9. Drugbank. Propranolol [Internet]. [cited 2021 Apr 29]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00571>
10. Vashistha VK, Kumar A. Stereochemical facets of clinical β -blockers: An overview. *Chirality.* 2020;32(5):722–35.
11. World Anti-Doping Agency. Betabloqueantes [Internet]. [cited 2021 Apr 30]. Available from: <https://www.wada-ama.org/es/content/lo-que-esta-prohibido/sustancias-prohibidas-en-cierto-deportes>
12. Accord Healthcare. Prospecto Propranolol Accord 10 mg [Internet]. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). 2018 [cited 2021 Apr 19]. p. 1–8. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/77174/P_77174.html
13. Bevinakatti HS, Banerji AA. Practical Chemoenzymatic Synthesis of Both Enantiomers of Propranolol. *J Org Chem.* 1991;56(18):5372–5.
14. Wade Jr. L. Condensation of Acids with Alcohols: The Fischer Esterification. In: *Organic Chemistry*. 8th ed. Pearson; 2012. p. 961–5.
15. Wade Jr. L. Synthesis of Aldehydes and Ketones from Acid Chlorides and Esters. In: *Organic Chemistry*. 8th ed. Pearson; 2012. p. 835–9.
16. Carey FA, Sundberg RJ. Advanced Organic Chemistry Part B: Reactions and Synthesis, 4th Ed. In: *Advanced Organic Chemistry Part B: Reactions and Synthesis*. 5th ed. Springer; 2007.

p. 2527–2527.

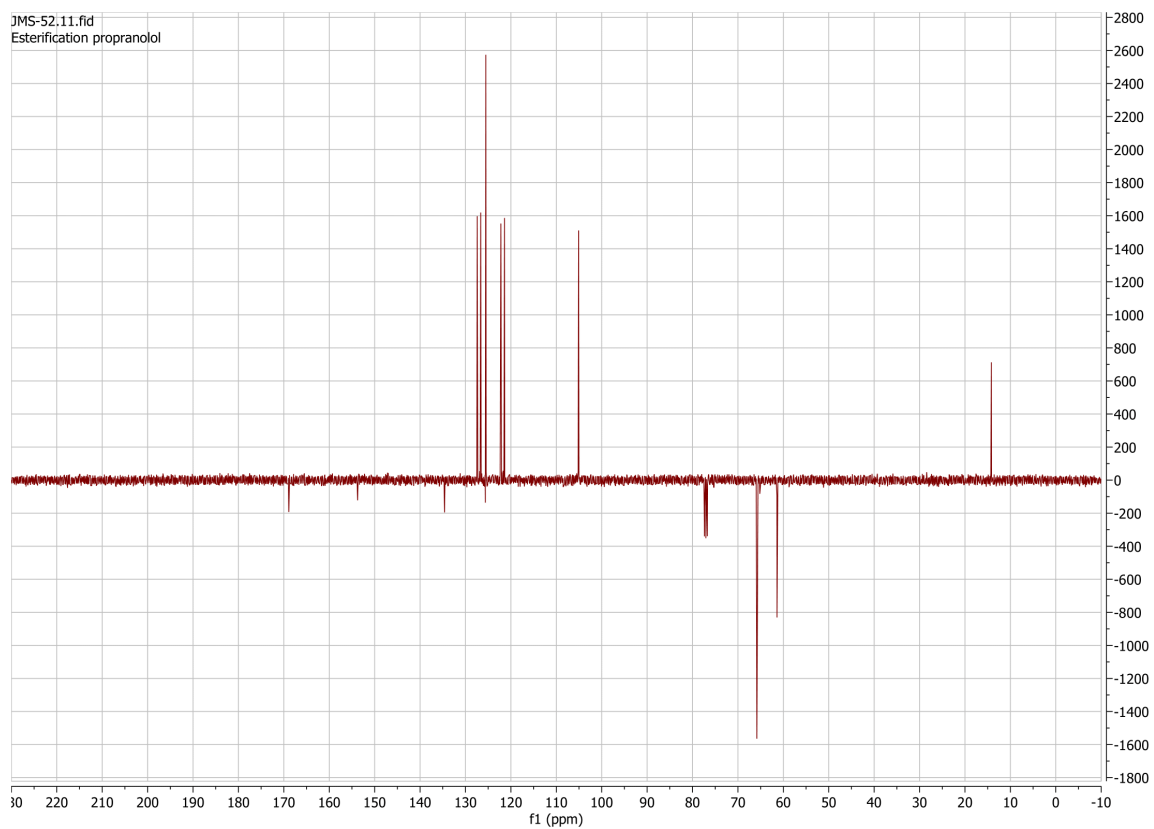
17. Ashenhurst J. Reagent Friday: Di-isobutyl Aluminum Hydride (DIBAL) [Internet]. 2020 [cited 2021 May 24]. Available from: <https://www.masterorganicchemistry.com/2011/08/26/reagent-friday-di-isobutyl-aluminum-hydride-dibal/>
18. Díaz-Rodríguez A, Martínez-Montero L, Lavandera I, Gotor V, Gotor-Fernández V. Laccase/2,2,6,6-tetramethylpiperidinoxyl radical (TEMPO): An efficient catalytic system for selective oxidations of primary hydroxy and amino groups in aqueous and biphasic media. *Adv Synth Catal*. 2014;356(10):2321–9.
19. Gotor-Fernández V, Díaz-Rodríguez A, Lavandera I, Kanbak-Aksu S, Sheldon RA, Gotor V. From diols to lactones under aerobic conditions using a laccase/TEMPO catalytic system in aqueous medium. *Adv Synth Catal*. 2012;354(18):3405–8.
20. Feng Y, Shen M, Wang Z, Liu G. Transformation of atenolol by a laccase-mediator system: Efficiencies, effect of water constituents, and transformation pathways. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019;183(August).
21. Tromp SA, Matijošyte I, Sheldon RA, Arends IWCE, Mul G, Kreutzer MT, et al. Mechanism of Laccase-TEMPO-Catalyzed Oxidation of Benzyl Alcohol. *ChemCatChem*. 2010;2(7):827–33.
22. Bassanini I, Ferrandi EE, Riva S, Monti D. Biocatalysis with laccases: An updated overview. *Catalysts*. 2021;11(1):1–30.
23. Decembrino D, Girhard M, Urlacher VB. Use of Copper as a Trigger for the in Vivo Activity of *E. coli* Laccase CueO: A Simple Tool for Biosynthetic Purposes. *ChemBioChem*. 2021;22(8):1470–9.
24. Lorenzo M, Moldes D, Rodríguez Couto S, Sanromán MA. Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere*. 2005;60(8):1124–8.
25. Heath RS, Birmingham WR, Thompson MP, Taglieber A, Daviet L, Turner NJ. An Engineered Alcohol Oxidase for the Oxidation of Primary Alcohols. *ChemBioChem*. 2019;20(2):276–81.
26. Baer HH, Coombes RG, Myhre PC, Nielsen AT. The nitro group in organic synthesis. Vol. 39, *Choice Reviews Online*. Wiley-VCH; 2001. 39-2805-39–2805 p.
27. Kürti L, Czako B. Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis. Hayhurst J, editor. *Elsevier Academic Press*; 2005. 810 p.
28. Busto E, Gotor-Fernández V, Gotor V. Protein-mediated nitroaldol addition in aqueous media. Catalytic promiscuity or unspecific catalysis? *Org Process Res Dev*. 2011;15(1):236–40.
29. Sheldon RA, Brady D, Bode ML. The Hitchhiker's guide to biocatalysis: Recent advances in the use of enzymes in organic synthesis. *Chem Sci*. 2020;11(10):2587–605.
30. Wang Y, Cheng H, Li X, Li LL, Liang ZH, Liang XY, et al. MML-catalyzed direct aldol reaction in green solvents. *Biomass Convers Biorefinery*. 2020;
31. Yu X, Pérez B, Zhang Z, Gao R, Guo Z. Mining catalytic promiscuity from: Thermophilic archaea: An acyl-peptide releasing enzyme from *Sulfolobus tokodaii* (ST0779) for nitroaldol reactions. *Green Chem*. 2016;18(9):2753–61.
32. Tasdighi E, Azar ZJ, Mortazavi SA. Development and In-vitro evaluation of a contraceptive vagino-adhesive propranolol hydrochloride gel. *Iran J Pharm Res*. 2012;11(1):13–26.
33. Overman J, Fontaine F, Sears JW, Moustaqil M, Huang L, Meurer M, et al. R-propranolol is a small molecule inhibitor of the SOX18 transcription factor in a rare vascular syndrome and hemangioma. *Elife*. 2019;8:1–15.

Anexos

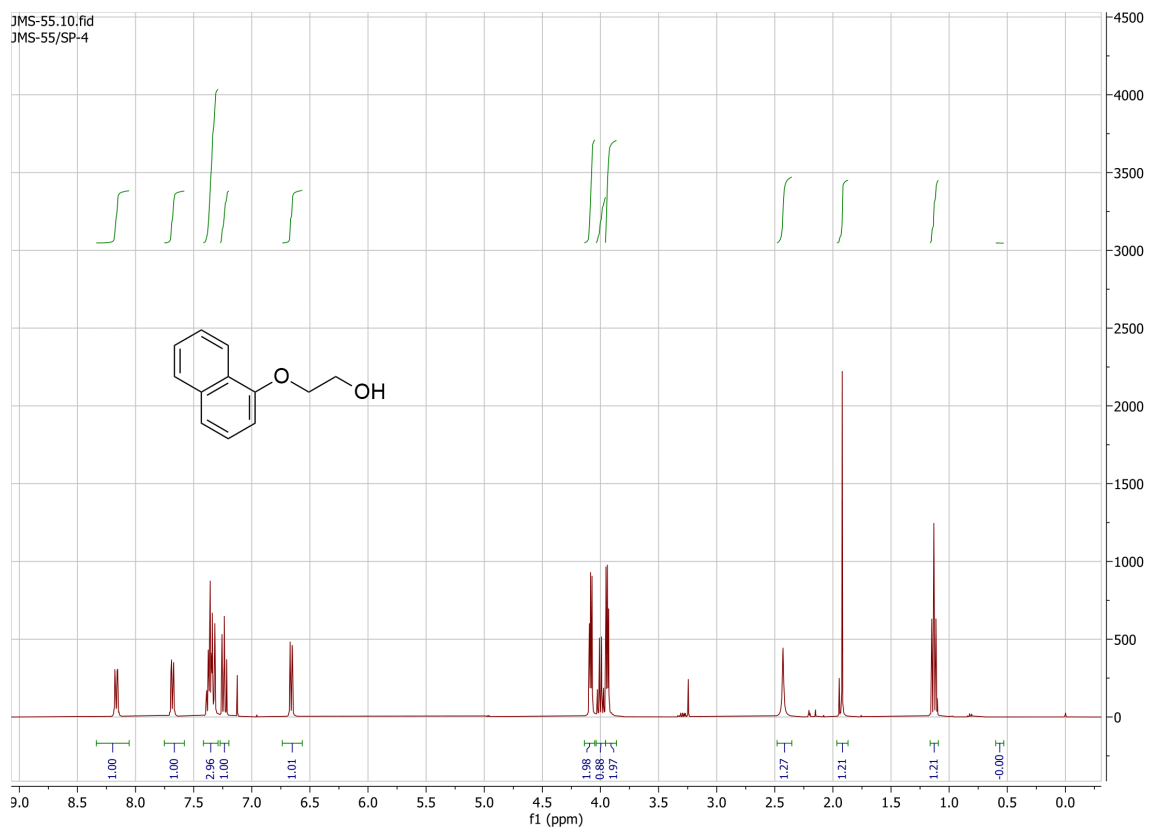
Anexo 1: Espectros RMN de los compuestos 2-5



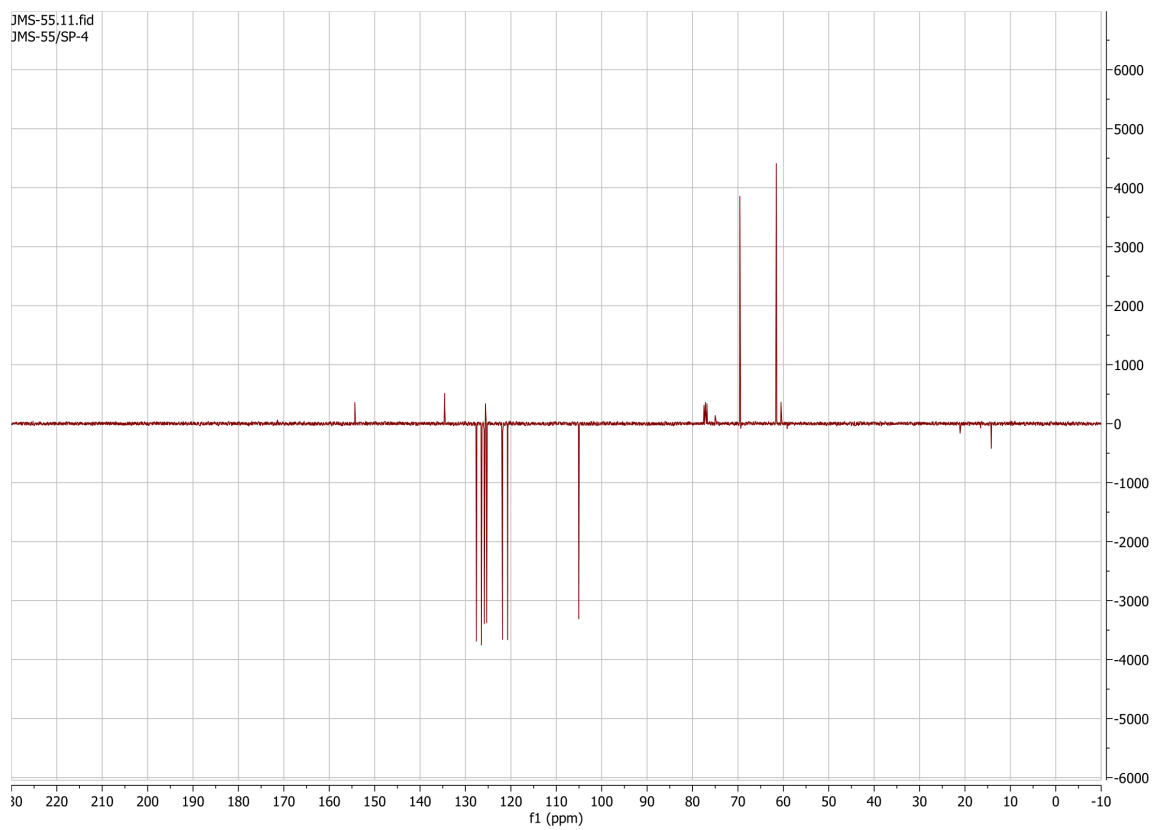
Espectro ¹H-RMN del compuesto **2** en CDCl₃



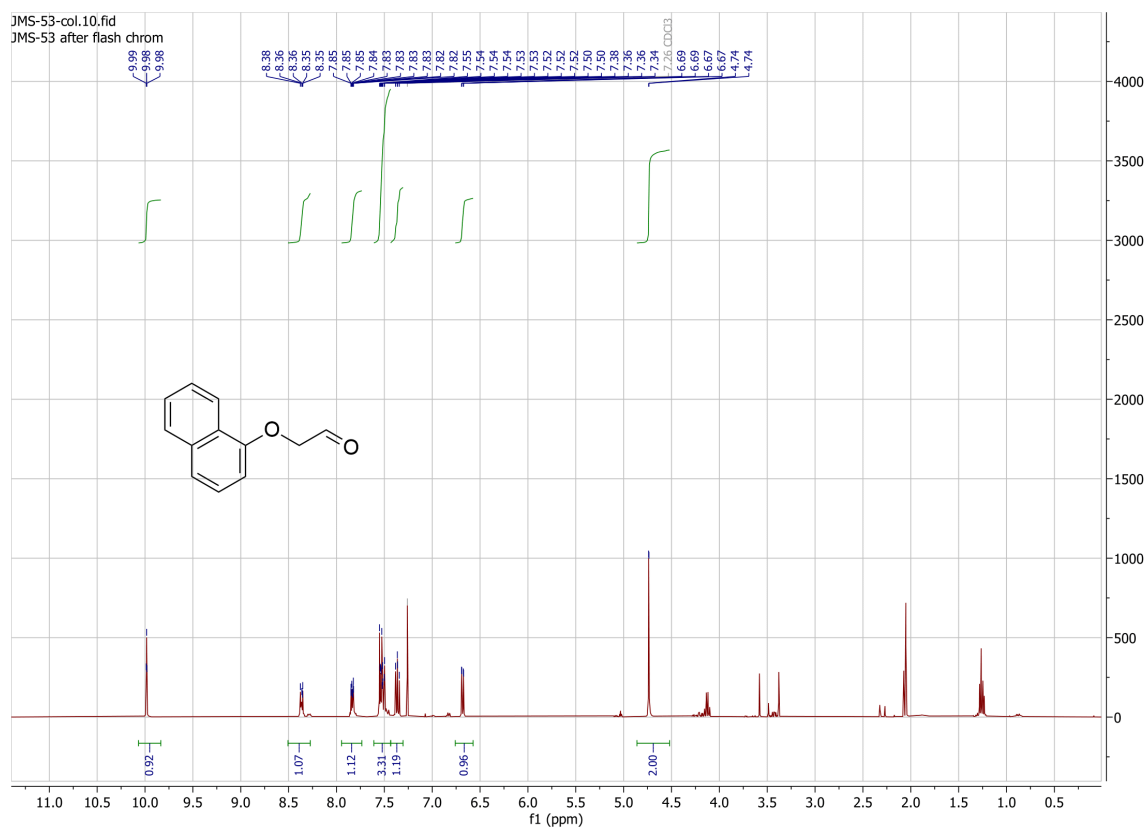
*Espectro ^{13}C -RMN (APT) del compuesto **2** en CDCl_3*



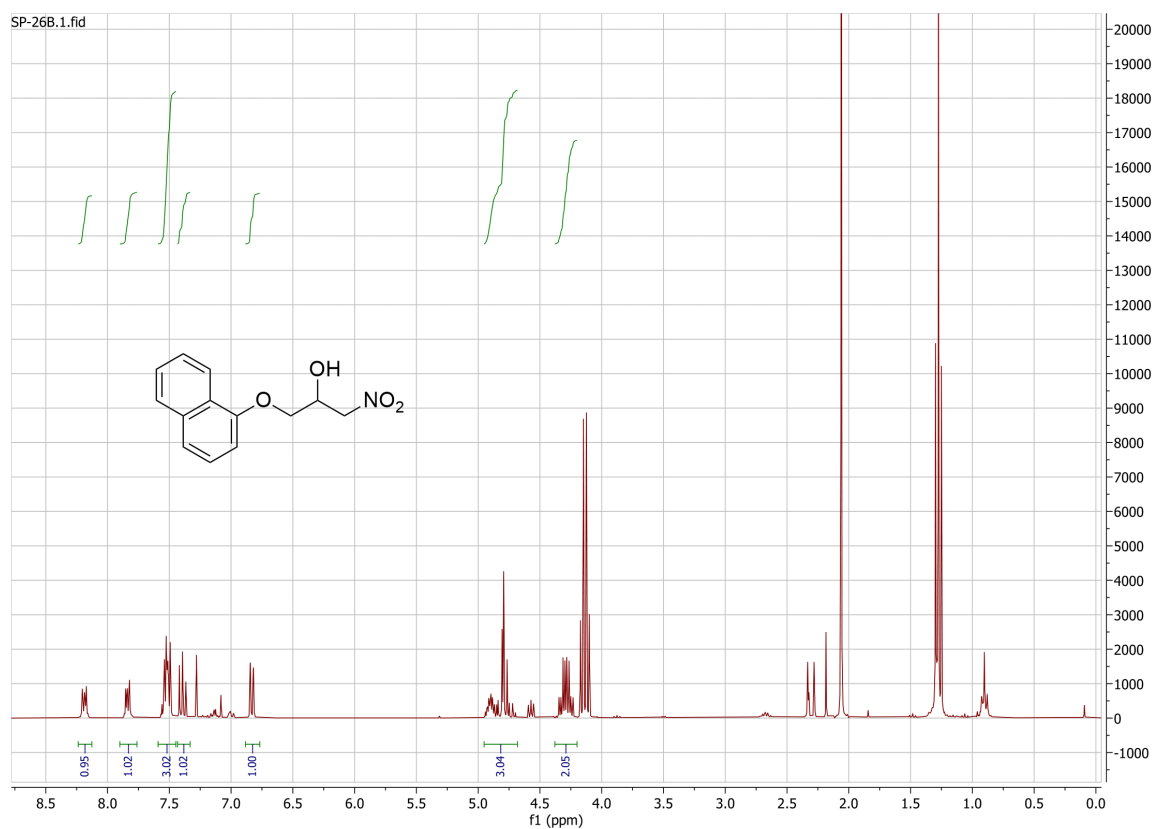
*Espectro ^1H -RMN del compuesto **3** en CDCl_3*



*Espectro ^{13}C -RMN (APT) del compuesto **3** en CDCl_3*



Espectro ¹H-RMN del compuesto 4 en CDCl₃



Espectro ¹H-RMN del compuesto 5 en CDCl₃